

Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II)
Georg-August-Universität Göttingen

Thèse de doctorat
Doktorarbeit

PHILIPPE GASTREIN

**Courant H et rythmes θ dans les structures
corticales : un exemple du rôle des courants
intrinsèques dans l'organisation temporelle de
l'activité de réseau.**

**H-Strom und kortikale θ -Rhythmen : ein Beispiel für
die Rolle intrinsischer Ströme bei der zeitlichen
Organisation von Netzwerkaktivität.**

Pr. André Nieoullon

Président

Präsident

Dr. Nicole Ropert

Rapporteuse

Gutachterin

Prof. Dr. med. Jan Behrends

Rapporteur

Gutachter

Dr. Dominique Debanne

Co-directeur de thèse (France)

Doktorvater (Frankreich)

Prof. Dr. Rainer Kree

Co-directeur de thèse (Allemagne)

Doktorvater (Deutschland)

Résumé

Le courant cationique activé par l'hyperpolarisation (courant H) est impliqué dans l'organisation temporelle de l'activité neuronale. Nous montrons que le courant H améliore la synchronisation et la régularité des oscillations thêta dans l'hippocampe et dans le néocortex in vitro. Il détermine les oscillations thêta par la définition de résonance intrinsèque de membrane, la fidélité de décharge et le couplage entre potentiels postsynaptiques et décharge. Les cinétiques du courant H sont modulées par l'AMPC. Nous montrons que l'augmentation de l'activité synaptique provoque une augmentation de la concentration en AMPC intracellulaire qui pourrait réguler les oscillations de l'activité de réseau. Ces résultats illustrent le rôle clef d'un courant intrinsèque dans l'organisation temporelle de l'activité des neurones en réseau. La modulation des propriétés cinétiques du courant H peut agir comme un régulateur de fréquence.

Inhaltsangabe

Der durch Hyperpolarisation aktivierte, kationische Einwärtsstrom (I_H -Strom) ist in die zeitliche Organisation neuronaler Aktivität involviert. Wir zeigen, dass der I_H -Strom die Synchronisation und die Regelmäßigkeit der Theta-Oszillationen im Hippocampus und im Neocortex in vitro verbessert. Er beeinflusst die Theta-Oszillationen durch die Vorgabe einer intrinsischen elektrischen Resonanz, desweiteren durch die Genauigkeit der Aktionspotentialauslösung sowie durch die Kopplung zwischen den postsynaptischen Potentialen und der Aktionspotentialauslösung. Die Kinetik des I_H -Stromes wird durch cAMP moduliert. Wir zeigen, dass die Steigerung der synaptischen Aktivität eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration verursacht, welche die oszillierende Netzwerkaktivität regulieren könnte. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Schlüsselrolle eines intrinsischen Stromes wie der I_H in der zeitlichen Organisation einer Netzwerkaktivität von Nervenzellen wie die kortikale Theta-Oszillationen. Unsere Studie läßt uns vorschlagen, dass die Modulation der kinetischen Eigenschaften des I_H -Stromes hierbei wie ein Frequenzstimmer wirken.

H current and theta rhythms in cortical structures : an example of the role of intrinsic currents in the temporal organisation of network activity.

Abstract

The hyperpolarisation-activated current (h-current) is involved in the temporal organisation of neuronal activity. We show that h-current enhances synchronisation and regularity of theta oscillations in the hippocampus and in the neocortex in vitro. It locks theta oscillations via intrinsic resonance and enhanced temporal spiking fidelity. Kinetics of h-current is modulated by cAMP. We show that increased synaptic activity evokes an increase in intracellular cAMP concentration which could regulate network activity oscillations. These results illustrate the key role of an intrinsic current in the temporal organisation of neuronal network activity. The modulation of h-current kinetics can act as a frequency tuner.

À tout ceux qui m'ont entouré pendant cette thèse, à ceux qui sont nés, à ceux qui sont morts...

Merci à mes parents.

Un grand merci à ceux avec qui j'ai travaillé, échangé, interagit au cours de ce travail de thèse, à Marseille et à Göttingen, parce que les idées ne nous appartiennent pas, quoiqu'on en pense... Je suis spécialement reconnaissant envers Dominique Debanne qui a été pour moi réellement un "Doktorvater", qui m'a appris comment faire de la science ici et maintenant. Ich bedanke mich für die Zusammenarbeit, für die vielfältigen Hilfe und für den Spaß bei Peter Salonikidis.

Je remercie Norbert Ankri pour ses programmations informatiques, pour son aide sur les concepts mathématiques et physiques et pour les discussions passionnées. Je remercie Laure Fronzaroli pour son aide technique et tout simplement pour sa présence apaisante pendant les dissections. Ich bedanke mich für die technische Hilfe, besonders für die Vorbereitung der organotypischen Kultur, bei Dagmar Czran. Die Intelligenz der Hände gehören auch der experimentalen Wissenschaft. Les sciences expérimentales sont aussi l'expression de l'intelligence des mains, quoiqu'on en pense...

Cette thèse a été financée par une bourse couplée du ministère de la recherche, et pour les huit derniers mois, par une bourse de la Fondation pour la Recherche Médicale.

Je remercie très chaleureusement tout ceux chez qui j'ai habité, squatté, colloqué pendant mes séjours successifs de part et d'autre du Rhin. Merci Michel Lombard et la paroisse de Saint-Joseph ; Danke Doreen, Klaus, Okka und den Freunden aus der Schildweg-WG ; Merci Julien, Julie, et Corentin ; Merci Marie-Blanche ; Obrigado Fernanda ; Merci Louis-Noël, le troubadour massilio-jurassien. Merci encore papa et maman et merci aux Josquin, Sylvie, Olivier, Antoine, Gilles, Adrien, qui m'avaient supporté dans tout les sens du terme pendant les mois de rédaction. Vous tous avez été un lien précieux à d'autres réalités quotidiennes que celle de l'ascèse de la recherche. Je souhaite que ce travail de recherche soit, d'une manière ou d'une autre, *pour vous* : pour vos rêves, pour votre futur, pour votre compréhension du monde et de vous même, pour notre ouverture à d'autres formes de mystère et d'émerveillement...

Muchas gracias Eva. Cada dia un poco más...

Table des matières

0.1	Abbréviation	1
1	Zusammenfassung	2
I	Introduction	6
2	Le courant activé par l'hyperpolarisation et modulé par les nucléotides cycliques	8
2.1	Propriétés électrophysiologiques du courant I_H	8
2.1.1	Signature électrophysiologique du courant I_H	9
2.1.2	Le courant I_H : un ressort électrophysiologique ?	13
2.2	Diversité des courants I_H	14
2.2.1	Diversité des canaux responsables du courant I_H	14
2.2.2	Données de biophysique	17
2.2.3	Hétéromérisations possibles des canaux HCN	20
2.2.4	Modulation par les nucléotides cycliques	20
2.2.5	Autres voies de modulation des courants I_H	24
2.2.6	Pharmacologie du courant I_H	26
2.3	Patrons spatio-temporels d'expression des gènes HCN dans le SNC	28
2.3.1	Patron d'expression des différentes isoformes HCN à l'état adulte dans le SNC mammifère	29
2.3.2	Patron d'expression des différentes isoformes HCN pendant le développement	33
2.3.3	Plasticité de l'expression des protéines HCN	36
2.4	Fonctions	38
2.4.1	Le courant I_H : un courant "pacemaker"	40
2.4.2	I_H et le potentiel de repos	43
2.4.3	I_H et intégration dendritique	44
3	Organisation temporelle de l'activité de réseau et courants intrinsèques	49

3.1	Organisation temporelle de l'activité de réseau dans le SNC	49
3.1.1	Enjeux de la compréhension du codage temporel	49
3.1.2	Mécanismes computationnelles de l'organisation temporelle de l'activité de réseau	50
3.2	Rôle des canaux ioniques intrinsèques dans la précision et la synchronisation	51
3.2.1	Résonance intrinsèque	51
3.2.2	Précision temporelle de la décharge d'un potentiel d'action en réponse à un PPS	58
3.2.3	Synchronisation	72
3.3	Les oscillations θ et le courant I_H dans les structures corticales	76
3.3.1	Description des rythmes θ	76
3.3.2	Rôle de I_H dans la génération et la synchronisation des rythmes θ : données expérimentales	77
3.3.3	Mécanismes au niveau cellulaire par lesquels le courant I_H peut participer à la génération et à la synchronisation d'oscillations θ .	82
3.3.4	Modèles informatiques	84
4	Questions	88
4.1	Par quels mécanismes un courant membranaire comme I_H participe à la génération et à la synchronisation des oscillations θ à travers les réseaux corticaux ?	88
4.2	La modulation des propriétés cinétiques du courant I_H peut-elle modifier les caractéristiques des oscillations θ ?	90
5	Méthodes	91
5.1	Électrophysiologie	91
5.2	Caractérisation des oscillations	91
5.3	Évaluation de la concentration en AMPc intracellulaire	92
5.3.1	Principes du FRET	92
5.3.2	Détecteur de la $[AMPc]_i$	92
II	Resultats	95
6	Le courant I_H détermine les oscillations corticales via la résonance intrinsèque, la fidélité de décharge et le couplage entre potentiels postsynaptiques et décharge	96
7	La variation de la concentration en AMPc intracellulaire pendant des oscillation θ dans des cultures hippocampales organotypiques influence	

la synchronisation des oscillations et modulerait le courant I_H	98
7.1 Introduction	100
7.2 Material and Method	101
7.2.1 Organotypic cultures	101
7.2.2 cAMP sensor	101
7.2.3 Electrophysiology	105
7.3 Results	107
7.3.1 Activation of cAMP production increase the CFP/YFP ratio in CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP transfected cells	107
7.3.2 Network activity induces elevation of $[cAMP]_i$	109
7.3.3 Increase in $[cAMP]_i$ starts from periphery and spreads to soma	127
7.4 Discussion	130
7.4.1 Variations of $[cAMP]_i$ during network activity in the hippocampus	130
7.4.2 Methodology	132
7.4.3 Outlooks	133
III Discussion	136
8 Rôles du courant I_H dans la synchronisation et la régularité des oscillations θ dans les structures corticales	137
8.1 Le courant I_H n'est pas nécessaire pour l'apparition d'oscillations θ mais améliore leur régularité à travers l'organisation temporelle des caractéristiques de réponse des neurones à l'activité de réseau	137
8.1.1 Le blocage du courant I_H diminue la régularité et la synchronisation des oscillations θ <i>in vitro</i>	137
8.1.2 Mécanismes par lesquels I_H améliore la régularité et la synchronisation	138
8.2 La variation de la concentration en AMPc intracellulaire pendant les oscillations θ peut participer à leur régulation en modulant le courant I_H	139
8.2.1 L'activité synaptique provoque une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire	140
8.2.2 Changements des oscillations θ et modulation du courant I_H pendant un épisode oscillatoire spontanée	141
8.2.3 Scénario hypothétique de l'interaction entre oscillations, AMPc et I_H dans l'hippocampe	141
9 Validité et limitations des résultats	143
9.1 Pertinence des oscillations θ <i>in vitro</i> et en culture	143

9.1.1	Modèles <i>in vitro</i> d'initiation des oscillations θ	143
9.1.2	Oscillations θ <i>in vitro</i> "résistantes à l'atropine"	144
9.1.3	Oscillations θ dans les cultures organotypiques d'hippocampe	144
9.1.4	Oscillations θ <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	145
9.2	Mesure de la concentration en AMPc intracellulaire	145
9.2.1	Indicateurs de la $[AMPc]_i$ basés sur le FRET	145
9.2.2	Suivi de la $[AMPc]_i$ par la mesure de l'efficacité du FRET	147
9.3	Le courant I_H dans les conditions expérimentales	147
9.3.1	Le courant I_H et la température	147
9.3.2	Variation de la sensibilité du courant I_H à l'AMPc pendant le développement	147
10	Perspectives	149
10.1	I_H , le bouton de modulation de fréquence du codage temporel?	149
10.2	Le courant I_H , un acteur parmi d'autres du codage temporel. Le courant I_H , jamais cavalier seul?	150

Liste des tableaux

2.1	Paramètres électrophysiologiques des courant I_H générés par les différents isoformes HCN dans des systèmes d'expression	18
2.2	Paramètres électrophysiologiques des courant I_H dans différents contextes cellulaires	39
3.1	I_H , I_M , $I_{Na,P}$, I_{KIR} et résonance dans différents types de neurones	56
7.1	Time shift between carbachol-induced depolarisation and network synaptic activity-induced production of cAMP	110
7.2	Increase of $[cAMP]_i$ in response to spontaneous synaptic activity	115
7.3	Spreading velocities of cAMP elevation	128

Table des figures

2.1	Caractérisation de I_H dans les neurones néocorticaux de la couche 5 . . .	11
2.2	Sensibilité du courant I_H à l'AMPC	12
2.3	Différentes propriétés électrophysiologiques selon la nature des canaux HCN	16
2.4	Structures tertiaire et quaternaire de HCN	19
2.5	Courants I_H et isoformes HCN exprimés dans différents types de neurone	31
2.6	Gradient croissant de la densité de courant I_H et de la concentration en canaux HCN1 dans les cellules pyramidales	34
2.7	I_H : courant pacemaker	41
2.8	Mise en forme des PPS par le courant I_H	46
2.9	Normalisation de la sommation de PPS le long des dendrites par le courant I_H	47
3.1	Caractérisation des propriétés de résonance des neurones	53
3.2	Définition des propriétés de résonance par les courants intrinsèques . . .	55
3.3	Résonance H et résonance M dans les cellules pyramidales	57
3.4	Couplage E-S différencié dans les interneurons et les cellules pyramidales de CA1	60
3.5	La vitesse de dépolarisation détermine la précision de décharge	62
3.6	Mise en forme des PPSI rapide et lent dans les cellules pyramidales par I_H et $I_{Na,P}$	64
3.7	Effet synchronisateur des PPSI dans les cellules pyramidales de CA1 . . .	65
3.8	La succession de courants entrant et sortant détermine le décours temporel des PPSE de cellules pyramidales et d'interneurones	67
3.9	L'inhibition antérograde améliore la précision de décharge suite à un PPSE	69
3.10	Interaction des récepteurs $GABA_A$ et du courant I_H pour améliorer la précision de la détection de coïncidence	71
3.11	L'activation de courants entrant et sortant pendant une activité synaptique à forte variance augmente la précision de décharge	73
3.12	Codage par précession de phase par rapport à l'oscillation θ et I_H	75
3.13	Patrons de décharges des différents types cellulaires pendant un cycle θ .	78

3.14	Disparition des oscillations θ dans l'hippocampe après application de ZD7288 (100 μM)	80
3.15	Désorganisation des oscillations θ dans le cortex moteur après blocage du courant I_H	81
3.16	Modèle informatique indiquant le rôle de I_H dans la synchronisation des oscillations θ dans l'hippocampe	87
5.1	Caractérisation d'un autocorrélogramme	93
7.1	cAMP sensor : Epac1 fused with CFP and YFP	103
7.2	Optical set-up for FRET measure	104
7.3	CFP/YFP ratio from cAMP sensor increase with activation of cAMP production in neuron-type cells	108
7.4	cAMP production follows carbachol-induced θ -oscillations	112
7.5	CFP/YFP ratio from cAMP sensor increase with activation of cAMP production in a DG granule cell	113
7.6	Production of cAMP occurs during spontaneous synchronous synaptic activity	116
7.7	Production of cAMP occurs during spontaneous theta oscillations	118
7.8	I_H changes after bursts of spontaneous θ -oscillations	121
7.9	End of spontaneous θ -oscillations are more synchronised as begin of θ oscillation	123
7.10	Change in regularity, synchronisation and period during oscillations disappears after blockade of I_H -current	126
7.11	cAMP production after carbachol-induced θ -oscillations starts in periphery and spreads to soma	129
10.1	L'influence des courants ioniques intrinsèques sur les PPSE dépendent de leur localisation	153

0.1 Abbréviation

AP	Action potential	PA	Potentiel d'action
cAMP	cyclic adenosin mono-phosphat	AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
$[cAMP]_i$	intracellular cAMP concentration	$[AMPc]_i$	concentration en AMPc intracellulaire
CNBD	Cyclic nucleotid binding domain		Domaine de liaison à l'AMPc
EPSP	Excitatory Postsynaptic Potential	PPSE	Potentiel postsynaptique excitateur
EPSC	Excitatory Postsynaptic Current	CPSE	Courant postsynaptique excitateur
FRET	Förster resonance energy transfer		Transfert d'énergie par résonance de Förster
HCN	Hyperpolarization activated Cation Non-selective Cyclic Nucleotid-modulated		
IPSP	Inhibitory Postsynaptic Potential	PPSI	Potentiel postsynaptique inhibiteur
IPSC	Inhibitory Postsynaptic Current	CPSI	Courant postsynaptique inhibiteur
PSP	Postsynaptic Potential	PPS	Potentiel postsynaptique
PDE	Phosphodiesterase		
CNS	Central nervous system	SNC	système nerveux central

Chapitre 1

Zusammenfassung

Der durch Hyperpolarisation aktivierte kationische Einwärtsstrom (H-Strom oder I_H) ist in mehreren kardialen und neuronalen Zelltypen beschrieben worden. Die HCN Proteine (für *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-modulated Cationic Non-selective*) bilden tetramerischen Transmembrankanäle, welchen den I_H leiten. Vier HCN Isoformen werden bei Säugetieren exprimiert. Eine Hyperpolarisation auf ein negatives Potential von -50 bis -70 mV aktivieren den I_H . Sein Umkehrpotential (ca. -20 mV) entspricht einem Gleichgewichtspotential einer schwach Na^+/K^+ -selektiven Leitfähigkeit. Der I_H -Strom ist deswegen einwärts gerichtet. Er wird relativ langsam aktiviert und deaktiviert : von 100 ms bis 1 s je nach exprimierten Isoformen unterschiedlich. Die direkte Bindung von cAMP an den HCN Kanal steigert das Membranpotential, von dem aus die Aktivierung des I_H anfängt, und beschleunigt die Aktivations- und Deaktivationskinetik. Die Empfindlichkeit des I_H zu cAMP hängt von der Kombination exprimierter HCN Isoformen ab. Die unterschiedlichen HCN Isoformen bestimmen auch verschiedenen Kinetik und Potentialeabhängigkeiten. Zum Beispiel HCN1 entspricht einem I_H mit schnellerer Aktivationskinetik und geringerer cAMP-Empfindlichkeit als HCN2.

Corticalen Nervenzellen exprimieren HCN1 und HCN2 nach einem spezifischen räumlichen und zeitlichen Muster. Die I_H -Dichte ist höher in Dendriten als im Soma bei Pyramidenzellen der neocorticalen Schicht V und bei hippocampalen CA1-Pyramidenzellen. CA1-Pyramidenzellen exprimieren HCN2-Kanäle am ersten postnatalen Tag. Im Laufe der folgende Entwicklung wird dann die Isoform HCN2 durch HCN1 ersetzt.

Die Funktionen des I_H werden meistens mit dem besonderen zeitlichen Verhalten den Nervenzellen wegen seiner langsamen Kinetik verbunden. Durch seine Teilnahme an Schrittmachermechanismen (*pacemaker*) ist der I_H verantwortlich für die Auslösung spontaner Rhythmen im Herz, im Thalamus sowie im Hippocampus. Zudem definiert der I_H in Pyramidenzellen aus CA1 und Schicht V die Resonanz der auftretenden Theta-Frequenz (im

Bereich von 3-8 Hz). Der I_H spielt auch eine Rolle in der dendritischen Integration postsynaptischer Potentiale. Ein Teil an HCN-Kanäle ist während des Ruhepotentials aktiviert. Die auf ein EPSP folgende Repolarisation wird durch eine weiterentwickelnde Deaktivierung des I_H beschleunigt. Bei Pyramidenzellen werden die in Dendriten entstandenen EPSP breiter, als die in Soma entstandenen EPSP wegen des passiven Membranwiderstands. Der I_H gleicht den Effekt des passiven Membranwiderstands auf dem zeitlichen Verlauf der EPSP aus. Ebenfalls wird eine durch ein IPSP verursachte Hyperpolarisation durch den I_H verkürzt, weil die Aktivierung des I_H im Verlauf des IPSP verzögert eintritt.

Der Verlauf des IPSP wird durch die fortgeführte Aktivierung des I_H während der Hyperpolarisation verkürzt.

Viele theoretische und experimentelle Arbeiten deuten darauf hin, dass die Zeitorganisation der Netzwerkaktivität von Nervenzellen für die neuronale Informationskodierung wichtig ist. Die Koinzidenzerkennung und die synchronisierte rhythmische Aktivität sind zwei Beispiele des Zusammenhangs zwischen Kodierung und Zeitorganisation. Diese beiden Ereignisse verlangen zeitliche Genauigkeit in jedem Schritt der Signalfortleitung im neuronalen Netzwerk. Intrinsische Ionenkanäle beeinflussen besonders die Kopplung zwischen den synaptischen Eingänge und der Entstehung von Aktionspotentialen in einer Zelle. Eine elektrische Resonanz wird durch das zeitliche Zusammenspiel der Ströme I_H , I_M , I_{KIR} und $I_{Na,P}$ bei Pyramidenzellen vorgegeben. Die zeitliche Genauigkeit der Kopplung zwischen EPSP und Aktionspotential (E-S Kopplung genannt) hängt von der Depolarisationsgeschwindigkeit und von der Depolarisationsdauer ab. Die Aktivierung Einwärtsströmen beschleunigt die Depolarisation. Und die Aktivierung Auswärtsströmen kürzt die Depolarisation ab. Das Timing der Aufeinanderfolge von Einwärtsströmen zu Auswärtsströmen während eines EPSP bestimmt die zeitliche Genauigkeit der E-S Kopplung. Die Regelmäßigkeit bei der Wiederholfrequenz von Aktionspotentialen während spontaner Aktionspotentialauslösung wird durch eine Aktivierung von Einwärtsströmen während der Nachhyperpolarisation (AHP) bestimmt. Und IPSP können auf sie nachfolgende Aktionspotentiale durch die Auslösung eines Depolarisationsanstiegs synchronisieren.

Oszillationen sind ein Merkmal für die Synchronisierung zusammenhängender Zellen. Mehrere experimentelle und theoretische Untersuchungen weisen darauf hin, dass I_H für die Auslösung und die Fortleitung von Theta-Oszillationen wichtig ist. Theta-Oszillationen verschwinden nach der pharmakologischen Blockade des I_H in vivo und in vitro. Aber es bleiben Zweifel über die Spezifität der Blockade. Simulationen zeigen, wie wichtig I_H für die Synchronisierung von Theta-Oszillationen im Netzwerk ist.

Während unserer Arbeit haben wir versucht, die folgenden Fragen zu untersuchen :

- Wie wichtig ist tatsächlich I_H für in vitro Theta-Oszillationen?
- Durch welchen Mechanismen wirkt I_H während der Theta-Oszillation?
- Kann I_H durch die Veränderung der intrazellulären Konzentration des cAMP ($[cAMP]_i$) während der Theta-Oszillation moduliert werden?

Theta-Oszillationen, die mit der Aktivierung muscarinerger Acetylcholinrezeptoren im Neocortex und Hippocampus in vitro erzeugen worden sind, verschwinden nicht nach der spezifischen Blockade des I_H . Die Netzwerkaktivität wird dennoch weniger synchronisiert und weniger regelmäßig als vor der Blockade.

Die Rolle der in *Stratum Oriens* liegenden Interneuronen bei der Auslösung von Theta-Oszillationen im Hippocampus ist bereits beschrieben. Der I_H ist in diesen Zellen anwesend. Er nimmt an spontanen und regelmäßigen Aktionspotentialauslösungen teil. Wir beweisen hier, dass der I_H eine Resonanz der Theta-Frequenz für die im *Stratum Oriens* liegenden Interneuron vorgibt. Zusätzlich zeigen wir, dass der I_H die Regelmäßigkeit bei der Wiederholffrequenz von Aktionspotentialen durch die Auslösung eines Einwärtsstromes während der Nachhyperpolarisation bestimmt. Untersuchungen haben bereits bewiesen, dass CA1-Pyramidenzellen durch rhythmische IPSP aus GABAergen Interneuronen synchronisiert werden. Wir zeigen nun, dass der I_H die zeitliche Genauigkeit der auf ein IPSP folgendes Aktionspotential durch einen nachträglichen Depolarisationsanstieg bestimmt. Pyramidenzellen aus CA3 und aus ausserhippocampal Nervenzellen projizieren glutamaterge Synapsen auf CA1-Pyramidenzellen. Der I_H bestimmt die zeitliche Genauigkeit der E-S Kopplung durch eine kürzere Dauer des EPSP.

Wir haben die Veränderungen von der $[cAMP]_i$ in hippocampalen organotypischen Kulturen mit Hilfe eines auf FRET basierten Sensors für die $[cAMP]_i$ verfolgt. Die $[cAMP]_i$ steigt nach einer Theta-Oszillation, welche durch die Aktivierung muscarinerger Acetylcholinrezeptoren induziert wurde, und ebenso während spontaner Theta-Oszillationen. Wir haben Hinweise, dass die Aktivationskinetik des I_H kurz nach Theta-Oszillationen beschleunigt ist, wenn die $[cAMP]_i$ angestiegen ist. Die Theta-Oszillationen sind zu ihrem zeitlichen Ende hin mehr synchronisiert. Die Veränderungen der Synchronisierung während der Oszillation verschwinden nach der Blockade des I_H . Mit dieser vorläufigen Untersuchung wollen wir folgende Hypothese vorschlagen: Die synaptische Aktivität bewirkt eine Erzeugung von cAMP (wahrscheinlich durch den Eintritt von Calcium durch die NMDA Rezeptoren. Adenylat Cyclasen werden durch Calcium aktiviert). Die Modulation des I_H durch cAMP verursacht die Synchronisierung von Theta-Oszillationen. Möglicherweise wird die Hochregulation des I_H die Oszillationen dämpfen, wie es bei thalamischen Delta-Oszillationen schon beschrieben worden ist.

Wir haben auch eine Ausbreitung des $[cAMP]_i$ Anstiegs in Zellen beobachtet. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit war langsamer als für eine frei Diffusion ($1, 1 \pm 0.8 \mu m^2/s$ versus

$400\mu m^2/s$) erwartet. Trotzdem bleibt die Erzeugung des cAMP nicht kompartmentiert, wie es bei neonatalen Herzmyocyten beschrieben worden ist.

Unsere Untersuchungen ergeben, dass der I_H nicht erforderlich für die Auslösung von Theta-Oszillationen ist, sondern dass er die Synchronisierung und die Regelmäßigkeit von Theta-Oszillationen steigert. Der I_H beeinflusst die intrinsische elektrische Resonanz in mehreren Zellen, wie die in *Stratum Oriens* liegenden Interneurone. Der I_H bestimmt die Regelmäßigkeit der Wiederholfrequenz von Aktionspotentialen bei der im Stratum Oriens liegenden Interneurone. Der I_H bestimmt die zeitliche Genauigkeit der I-S- (IPSP-Spike) und der E-S-Kopplung. Die synaptische Aktivität während der Oszillationserscheinungen verursacht ein Anstieg der $[cAMP]_i$. Dieser erhöhte $[cAMP]_i$ könnte wiederum den I_H modulieren, und dadurch die Oszillationen steuern. Die Modulation des I_H kann wie einer Frequenzstimmer auf neuronale Rhythmen wirken.

Première partie

Introduction

Le courant I_H est un courant cationique activé par l'hyperpolarisation, qui est présent dans un grand nombre de type neuronal. Nous nous sommes attachés dans notre étude à décrire le rôle du courant I_H dans l'organisation temporelle de l'activité de réseau dans les structures corticales. Nous montrons que le courant I_H améliore la synchronisation et la régularité des oscillations θ *in vitro* dans l'hippocampe et dans certaines régions du néocortex. Le courant I_H détermine les oscillations θ par la définition de résonance intrinsèque de membrane, la fidélité de décharge et la le couplage entre potentiels post-synaptiques et décharge. Les propriétés du courant I_H , particulièrement ces propriétés cinétiques, peuvent être modulées par l'AMPc. C'est pourquoi nous avons utilisé un marqueur optique de l'AMPc intracellulaire pour suivre les variations de la concentration en AMPc. Nous montrons que l'augmentation de l'activité synaptique induite par l'activation des récepteurs muscariniques ou spontanée provoque une augmentation de la concentration de l'AMPc intracellulaire. La synchronisation et la régularité sont meilleures à la fin d'une oscillation θ spontanée qu'au début. Le courant I_H semble être accéléré après une oscillation θ . Ces résultats nous permettent d'esquisser le scénario suivant : l'activité synaptique synchrone provoque une production d'AMPc (peut être via l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, suite à l'activation de récepteurs NMDA) ; l'AMPc accélère la cinétique d'activation du courant I_H et son activation débute à des potentiels plus dépolarisés ; le courant I_H améliore alors la synchronisation et la régularité de l'oscillation θ .

Ces résultats illustrent le rôle clef d'un courant intrinsèque activé dans le domaine infraliminaire de potentiel de membrane comme I_H dans l'organisation temporelle de l'activité des neurones en réseau. La modulation des propriétés cinétiques d'un tel courant peut agir comme un régulateur de fréquence.

Chapitre 2

Le courant activé par l'hyperpolarisation et modulé par les nucléotides cycliques

Découvert il y a maintenant trente ans [Noma and Irisawa, 1976], le courant I_H est un courant cationique activé par l'hyperpolarisation et modulé par les nucléotides cycliques qui présente une cinétique d'ouverture lente. Il s'est avéré que les protéines qui le conduisent en formant des canaux tétramériques à travers la membrane, les protéines HCN, sont exprimées de manière quasiment ubiquitaire. Le courant I_H est en effet impliqué dans un grand nombre de fonction, en particulier dans la génération de rythme dans le coeur et le système nerveux, mais aussi dans le codage temporel comme les phénomènes d'adaptation dans des récepteurs sensoriels ou l'intégration du signal dendritique.

Nous allons ici décrire les principales propriétés des courants I_H , leurs diversités, leurs distributions, leurs voies de modulation et leurs principales fonctions physiologiques, afin de mieux comprendre dans quelle mesure des courants membranaires exprimés par chaque cellule individuellement peuvent jouer un rôle dans un phénomène de réseau comme la synchronisation des oscillations θ .

2.1 Propriétés électrophysiologiques du courant I_H

I_f, I_q, I_h , courants drôles et bizarres... Noma et Irisawa observèrent les premiers en réalisant un enregistrement en tension imposée de fibre isolée du noeud sinusal de lapin un courant entrant rectifiant en réponse à une hyperpolarisation dont l'intensité

augmente avec le temps [Noma and Irisawa, 1976]. Une étude plus détaillée de ce courant "marrant" (*funny*, I_f) va permettre de le distinguer du courant entrant rectifiant potassique connu jusqu'alors, et de mettre en évidence son rôle dans la génération de rythme cardiaque [Brown et al., 1979]. Ce fut un cas de changement de paradigme, puisqu'auparavant on attribuait l'automaticité des décharges des cellules cardiaques, celles des fibres de Purkinje en particulier, à un courant potassique sortant qui s'atténuerait lentement après une décharge [Baruscotti et al., 2005]. La découverte de ce drôle de courant va obliger à interpréter autrement la dépolarisation consécutive aux décharges qui règle par sa régularité la fréquence cardiaque. Au lieu d'être la conséquence de la diminution constante d'un courant potassique sortant (alors appelé I_{K2}), il s'agit de l'augmentation d'un courant entrant mixte potassique et sodique [Brown et al., 1979][Difrancesco, 1993]. On découvrit la présence de ce drôle de courant dans beaucoup d'autres cellules cardiaques. Mais aussi dans le système nerveux central (SNC) où il fut d'abord appelé courant bizarre (I_q pour *queer current* ¹) [Halliwell and Adams, 1982]. Le terme I_H a d'abord été utilisé pour décrire le courant activé par l'hyperpolarisation dans les photorécepteurs en bâtonnet de la rétine [Attwell and Wilson, 1980]. Il est devenu le terme consensuel pour désigner les courants cationiques activés par l'hyperpolarisation, qui se sont avérés quasiment ubiquitaires (même si le terme I_f reste couramment utilisé dans le cœur, et qu'ils sont souvent surnommés *courant pacemaker* en raison de leur implication dans la génération de rythme).

2.1.1 Signature électrophysiologique du courant I_H

Les principales caractéristiques électrophysiologiques du courant I_H sont :

- l'activation du courant est associée à une augmentation de la conductance de membrane.
- l'enveloppe du courant de queue est très semblable à la cinétique d'activation.
- La courbe d'activation est bien décrite par une fonction de Boltzmann (Fig. 2.1b).
- La cinétique d'activation est relativement lente (entre 100 ms et quelques secondes) et dépend du potentiel de membrane (Fig. 2.1c)
- le potentiel d'inversion ne change pas après de grande ou de longue période d'activation du courant.

Détermination des caractéristiques électrophysiologiques du courant I_H En potentiel imposé, la caractérisation la plus standard des propriétés du courant I_H consiste en l'application d'une série de créneau pendant au moins une seconde à partir d'un

¹d'abord utilisé pour décrire le courant I_H dans les cellules pyramidales de CA1 de cochon d'inde.

potentiel suffisamment dépolarisé pour que tout courant I_H soit désactivé au départ (-50 ou -55 mV) jusqu'à des valeurs très hyperpolarisées (-110 à -120 mV). On observe l'activation progressive d'un courant entrant jusqu'à un maximum (Fig. 2.1b). On peut en déduire la courbe d'activation, caractérisée par le potentiel de demi-activation ($V_{\frac{1}{2}}$) et par la sensibilité au changement de potentiel (c'est à dire la raideur de la pente k), et la cinétique d'activation, dépendante du potentiel, qui peut être calculée à partir d'une exponentielle simple ou double selon les cas (Fig. 2.1c).

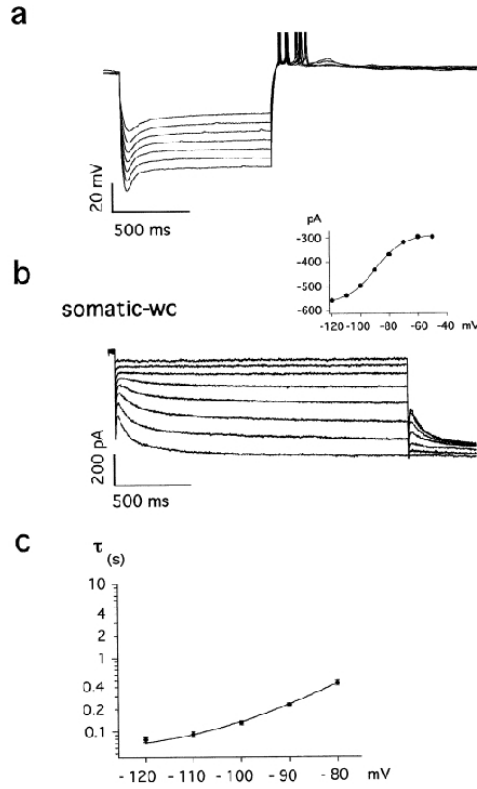
Pour évaluer l'importance du courant I_H au cours d'une mesure en courant imposé, un créneau de courant négatif permet d'observer une réponse typique durant laquelle le potentiel de membrane s'hyperpolarise jusqu'à un maximum, puis se dépolarise pendant que l'hyperpolarisation active le courant I_H jusqu'à un état d'équilibre. Quand l'hyperpolarisation cesse, le courant I_H met du temps à se désactiver, ce qui entraîne un rebond. Cette flexion en début de réponse à un créneau hyperpolarisant (*sag*) et le rebond qui le suit sont typiques de la présence du courant I_H (Voir Fig.2.1a).

Sensibilité à l'AMPC En présence d'AMPC la courbe d'activation du courant I_H se déplace vers des valeurs plus dépolarisées et la cinétique d'ouverture s'accélère (voir Fig.2.2). Il s'agit d'une des principales propriétés des courants I_H en terme fonctionnel. Nous verrons dans la partie suivante plus en détail les mécanismes de modulation par l'AMPC.

Absence d'inactivation Les courants I_H ne présentent pas d'inactivation quand ils sont activés par une hyperpolarisation constante, à l'exception du courant spHCN observé chez l'oursin. Cependant l'inactivation de spHCN semble correspondre à un état possible d'inactivation présent chez tout les courants I_H révélé par l'application d'une hyperpolarisation légère avant le pulse hyperpolarisant lui-même [Shin et al., 2004].

Distinction vis à vis des courant entrant rectifiant Un courant rectifiant anomal correspond à un courant dont la conductance augmente en réponse à une hyperpolarisation et diminue en réponse à une dépolarisation [Katz, 1949][Mayer and Westbrook, 1983]. Le courant I_H fait donc bien partie de cette catégorie. Ce qui le distingue des autres courants entrants rectifiants potassiques (I_{KIR}), c'est sa perméabilité cationique mixte et le fait qu'il n'est pas bloqué par le Ba^{+} extracellulaire. I_H et les I_{KIR} sont bloqués par le Cs^{+} extracellulaire [Pape, 1996].

Sélectivité surprenante Le courant I_H est un courant mixte sodique et potassique, avec un ratio $P_{Na^{+}}/P_{K^{+}}$ entre 0,2 et 0,4, ce qui définit un potentiel d'inversion E_{rev} entre



Franz et al. 2000

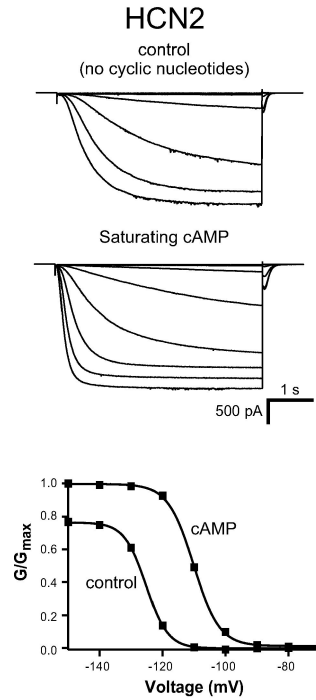
Fig. 2.1: Caractérisation de I_H dans les neurones néocorticaux de la couche 5

a) Réponses en courant imposé à des créneaux de courant négatif dans une cellule pyramidale néocorticale de la couche 5.

b) Réponses en potentiel imposé à des créneaux de potentiel hyperpolarisant; en encart, la courbe d'activation (conductance à l'équilibre en fonction du potentiel) est bien décrite par une fonction de Boltzmann.

c) Cinétique d'ouverture en fonction du potentiel de maintien.

extrait de [Franz et al., 2000]



Craven KB, Zagotta WN. 2006.
Annu. Rev. Physiol. 68:375–401

Fig. 2.2: Sensibilité du courant I_H à l'AMPc

Dépendance du courant I_H porté par des canaux HCN2 à l'AMPc : La conductance maximale et la cinétique d'activation sont plus grande en présence d'AMPc.

En haut : réponse à des créneaux de potentiel hyperpolarisants en mode potentiel imposé en absence d'AMPc (potentiel de maintien : 0 mV ; créneaux de -70 mV à -150 mV ; potentiel de retour : -40 mV). Au milieu : en présence saturante d'AMPc. En bas : courbes d'activation du courant I_H en présence et en absence d'AMPc.

[Craven and Zagotta, 2005]

-20 mV et -50 mV selon les types cellulaires [Pape, 1996]. Le courant I_H ne conduit pas le Li^+ [Ho et al., 1994], ce qui en fait le seul canal connu qui discrimine entre Li^+ et Na^+ . Il ne conduit pas le Rb^+ non plus [Wollmuth and Hille, 1992]. Le maximum de la conductance I_H est proportionnelle à la racine carrée de la concentration extracellulaire en potassium [Hestrin, 1987]. Le sodium est le porteur du courant entrant, important physiologiquement, tandis que le potassium est nécessaire pour la mise en place du courant lui-même [Pape, 1996]. Le courant I_H dépend de la présence de chlorure extracellulaire [Frace et al., 1992][Lenz et al., 1997].

Composante instantanée du courant I_H

Dès les premières descriptions du courant I_H , on a observé une composante instantanée, active dès le début de l'hyperpolarisation. C'est relativement tardivement que l'on étudia en détail la composante instantanée de I_H (aussi appelé I_{inst} ou VIC pour *voltage-independent current* [Proenza and Yellen, 2006]) sur le courant mesuré dans des cellules CHO exprimant HCN2. I_{inst} a le même potentiel d'inversion que I_H . I_{inst} agit sur le potentiel de membrane de manière analogue à un courant de fuite. Il est modulé par l'AMPc et le rapport entre chlorure extracellulaire et intracellulaire. Il est aussi bloqué par le ZD7288. Il est par contre insensible au Cs^+ extracellulaire [Proenza et al., 2002]. On a décrit la présence de I_{inst} notamment dans les neurones septo-hippocampaux GABAergiques [Xu et al., 2004].

2.1.2 Le courant I_H : un ressort électrophysiologique ?

Drôle de courant, courant bizarre... Le courant I_H est un courant aux propriétés et aux comportements très contre-intuitifs qui ont beaucoup surpris au moment de sa découverte. Il peut être actif au potentiel de repos, lequel est alors dépolarisé. Il est activé lentement par l'hyperpolarisation et il génère en réponse un courant entrant dépolarisant, contrebalançant l'hyperpolarisation qui l'a induit. Il a donc un comportement auto-limitant [Rosenbaum and Gordon, 2004]. En réponse à une dépolarisation, il est désactivé, ce qui diminue le courant entrant et s'oppose aussi à la dépolarisation. On peut le comparer à un ressort électrophysiologique qui amortit tout les changements de potentiel de membrane.

L'analogie avec un ressort fonctionne particulièrement bien par le fait que le courant I_H fonctionne avec différents modes selon ses propriétés cinétiques (analogue à la constante de raideur d'un ressort) et les échelles de temps des événements dans lesquels il est impliqué. Par exemple, dans les cas de comportements oscillatoires, le courant I_H entretient l'oscilla-

tion [Dickson et al., 2000], et celle-ci correspond plus ou moins à la fréquence de résonance que le courant I_H confère à la cellule [Hutcheon and Yarom, 2000][Hu et al., 2002]. Dans des cas d'événements plus lents que les cinétiques du courant I_H , celui-ci agit comme un amortisseur. C'est notamment le cas dans l'intégration du signal dendritique [Magee, 1998], ou dans les phénomènes d'adaptation dans les photorécepteurs [Demontis et al., 1999].

2.2 Diversité des courants I_H

Plusieurs types cellulaires expriment le courant I_H , dans le coeur, dans le système nerveux central et périphérique, dans des cellules sensorielles et dans des cellules endocrines et exocrines [Robinson and Siegelbaum, 2003]. La grande variété de caractéristiques électrophysiologiques que présentent ces courants I_H (Tableau.2.2) a laissé penser que ceux-ci sont produit par différentes protéines.

2.2.1 Diversité des canaux responsables du courant I_H

Clonage des gènes HCN

Le clonage des gènes responsables du courant I_H et l'identification des protéines correspondantes a eu lieu relativement tard, à la fin des années 1990. Presque simultanément les équipes de Santoro [Santoro et al., 1997][Santoro et al., 1998] et de Ludwig [Ludwig et al., 1998] remarquèrent des séquences présentant à la fois une forte homologie avec la superfamille des protéines-canaux potassiques, et, à proximité, une forte homologie avec le domaine de liaison aux nucléotides cycliques, déjà identifié chez les canaux ouverts par les nucléotides cycliques (CNG pour *cyclic nucleotid gated*). La nouvelle famille de protéine a été appelé HCN (pour *Hyperpolarization-activated Cation Non-selective Cyclic Nucleotid-modulated*) [Ludwig et al., 1998]. Quatre isoformes (HCN1 à HCN4) ont été identifiées chez les mammifères. Des homologues ont été aussi clonés chez l'oursin *strongylocentrotus purpuratus* (SpHCN), la drosophile (DmHCN) et le ver à soie (HvHCN) [Kaupp and Seifert, 2001]. SpHCN, exprimé dans le flagelle du spermatozoïde d'oursin, a été particulièrement utile pour étudier les propriétés biophysiques des canaux HCN.

Quatre isoformes HCN mammifères

Chaque isoforme HCN a été caractérisée électrophysiologiquement dans des systèmes d'expression hétérologue. Chacun est capable de produire seul une conductance I_H (Fi-

gure.2.3).

HCN1 correspond à un courant I_H rapide, de l'ordre de la centaine de milliseconde. Il est activé à des potentiels relativement dépolarisés ($V_{\frac{1}{2}}$ entre -70 mV et -60 mV), donc typiquement au potentiel de repos. Il est très faiblement modulé par l'AMPc.

Les canaux composés de **HCN2** conduisent un courant plus lent et nécessitant une plus forte hyperpolarisation pour être activé. Mais la présence d'AMPc décale très fortement la courbe d'activation vers des valeurs positives (de -95 mV à -65 mV) et accélère ses cinétiques (de 500 ms à 200 ms).

HCN3 a une cinétique lente (de l'ordre de la seconde), un $V_{\frac{1}{2}}$ intermédiaire entre celui de HCN1 et HCN2 et est très peu sensible à l'AMPc.

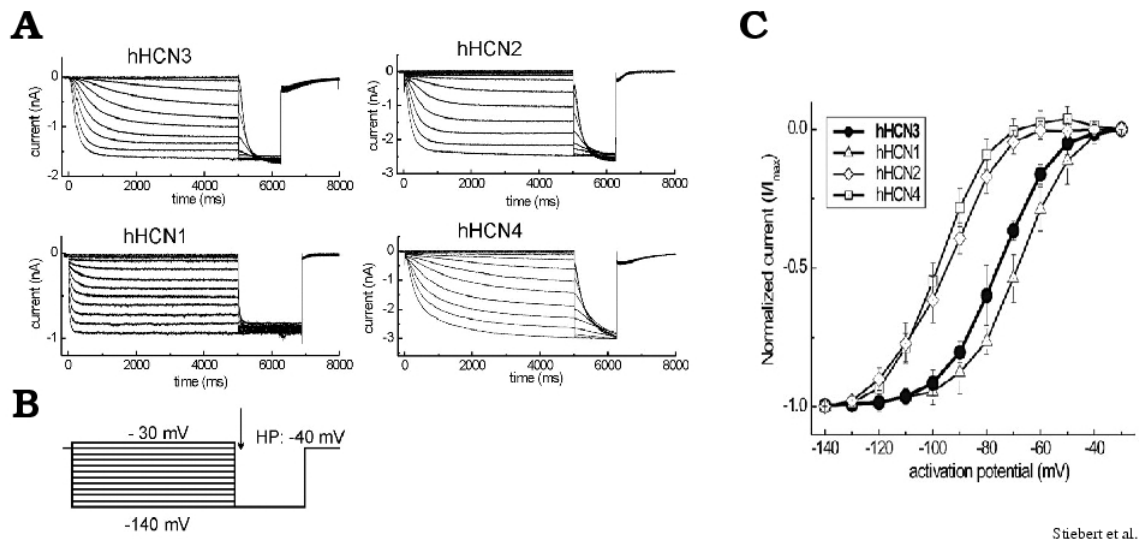
HCN4 a la cinétique la plus lente, un $V_{\frac{1}{2}}$ très négatif et est aussi très fortement modulé par l'AMPc, (un $V_{\frac{1}{2}}$ de -100 mV à -77 mV, et une constante de temps de 5 s à 1,5 s ; sans et avec AMPc).

On remarque que les quatre isoformes HCN forment des canaux aux propriétés complémentaires : HCN1 et HCN3 sont très peu sensibles à l'AMPc, HCN1 avec une cinétique rapide et HCN3 avec une cinétique plus lente ; HCN2 et HCN4 sont fortement modulés par l'AMPc, HCN2 ayant une cinétique en présence d'AMPc nettement plus rapide que HCN4 dans les mêmes conditions (Voir Tableau. 2.1 et Fig 2.3).

Évolution des gènes HCN

On peut regrouper les gènes HCN avec d'autres membres de la superfamille des canaux potassiques comportant un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD). Ce groupe comporterait outre HCN, les canaux CNG, EAG et KAT1. La formation d'un gène mosaïque réunissant le CNBD au canal potassique à six segments transmembranaires a dû se produire avant la divergence entre les phyla végétal, animal et mycète, car KAT1 est une protéine végétale et le CNBD de ces protéines est très proche de celui de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) de levure [Santoro and Tibbs, 1999].

Les gènes codant pour les protéines HCN sont apparus tôt dans l'évolution du règne animal. On trouve des gènes homologues HCN chez tous les vertébrés, les urochordés et les invertébrés. La phylogénie de ces gènes indique que la formation des 4 isoformes trouvés chez les mammifères est aussi très précoce. Elle aurait eu lieu entre la divergence entre urochordés et poissons. Ils formeraient donc un groupe de paralogues commun à tous les vertébrés. Leur importance fonctionnelle a dû être grande dès ce moment [Jackson et al., 2007].



Stieber et al. 2005

Fig. 2.3: Différentes propriétés électrophysiologiques selon la nature des canaux HCN
 A) Réponses de courant I_H exprimés de manière hétérologue (clone humain de HCN1, HCN2, HCN3, HCN4 exprimés par des cellules HEK293) en mode potentiel imposé à des créneaux de potentiel hyperpolarisants (en B). C) Courbes d'activation des courants I_H exprimés par les 4 isoformes dans un système hétérologue. [Stieber et al., 2005]

Il est surprenant que l'on n'ait trouvé aucun homologue de HCN chez le nématode *C. elegans*.

2.2.2 Données de biophysique

Les protéines HCN forment des canaux transmembranaires sous la forme de tétramère, à l'instar des autres protéines de la superfamille des canaux potassiques. Chaque sous-unité est constituée de 6 segment transmembranaires (S1 à S6) et entre S5 et S6 un élément P essentiel à la formation du pore. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont intracellulaires (voir Fig.2.4).

Mécanismes d'ouverture des canaux HCN

L'ouverture en réponse à une hyperpolarisation La sensibilité au voltage est due au segment transmembranaire S4, particulièrement riche en acide aminé chargé positivement. Il se déplace vers l'intérieur en réponse à une hyperpolarisation, à l'instar du segment S4 analogue des canaux potassiques activés par la dépolarisation (K_V). Cependant l'effet de ce déplacement est inverse. Là où il provoque une désactivation chez les K_V , il conduit à une activation chez les canaux HCN [Rosenbaum and Gordon, 2004].

Re-fermeture La saturation de la cinétique d'ouverture à des potentiels très hyperpolarisés (≤ -140 mV!) chez des canaux constitués de HCN2 révèle l'existence d'un taux de re-fermeture. Ce mécanisme de re-fermeture est absent chez HCN1. Ce qui explique la cinétique d'ouverture plus rapide chez HCN1 que chez HCN2. La liaison à l'AMPC module ce taux de re-fermeture, c'est pourquoi elle accélère la cinétique d'ouverture de HCN2 et beaucoup moins celle de HCN1 [Chen et al., 2007].

Effets physiques sur les canaux I_H

Sensibilité à la température Les cinétiques d'ouverture des canaux I_H sont particulièrement sensible à la température [DiFrancesco and Ojeda, 1980][Hart, 1983]. Elle double quasiment entre 23°C et 33°C [Magee, 1998]. Cette propriété a d'importante conséquence sur la valeur des résultats obtenus *in vitro* à des températures plus froide que les conditions physiologiques, surtout quand il s'agit de phénomènes où la cinétique de I_H est critique [Hu et al., 2002].

isoformes (type cellu- laire)	conditions contrôles			AMPC (1 μM à 1 mM)			Source
	$V_{\frac{1}{2}}$ (mV)	k (mV)	τ (ms)	$V_{\frac{1}{2}}$ (mV)	k (mV)	τ (ms)	
hHCN1 (HEK293)	-69,5	8,9	67 @-100 mV	-63,3	8,2	48 @-100 mV	[Stieber et al., 2005]
hHCN2 (HEK293)	-95.6	10,9	562 @-100 mV	-67,1	7,8	270 @-100 mV	[Stieber et al., 2005]
hHCN3 (HEK293)	-77,0	9,6	1244 @-100 mV	-79,9	8,6	1390 @-100 mV	[Stieber et al., 2005]
hHCN4 (HEK293)	-100	9,0	5686 @-100 mV	-77,5	9,4	1448 @-100 mV	[Stieber et al., 2005]
mHCN2 (HEK293T)	-100	8	330 @-140 mV	-90	8	160 @-140 mV	[Ludwig et al., 1998] [Mistrík et al., 2005]
mHCN3 (HEK293T)	-95	9,6	450 @-140 mV	-100	11,8	500 @-140 mV, N.S.	[Mistrík et al., 2005]
mHCN1 (oo. x., i/o)	-116	6.3		-111	4.9		[Chen et al., 2001b]
mHCN2 (oo. x., i/o)	-136	4.3		-119	4.3		[Chen et al., 2001b]
mHCN1 + mHCN2 (oo. x., i/o)	-130	4.4		-117	5.1		[Chen et al., 2001b]

Tab. 2.1: Paramètres électrophysiologiques des courant I_H générés par les différents isoformes HCN dans des systèmes d'expression

Caractéristiques électrophysiologiques de différents isoformes HCN dans différents systèmes hétérologues d'expression hétérologues. $V_{\frac{1}{2}}$ est le potentiel de demi-activation pour lequel la moitié des canaux sont ouverts (ou pour lequel la moitié de la conductance maximale est activée). k est la pente de la courbe d'activation, c'est à dire la sensibilité au changement de potentiel. τ est la constante de temps de l'activation du courant. Pour le courant I_H elle est en général du même ordre de grandeur que la cinétique de désactivation. Il y a des cas où la cinétique d'activation est mieux modélisée par une double exponentielle, donc avec deux constantes d'activation. Ici ne sont représentées que les plus rapides (τ_{fast}).

h : humain; m : murin; oo. x. : oocyte de xénope; i/o : enregistrement *inside out*

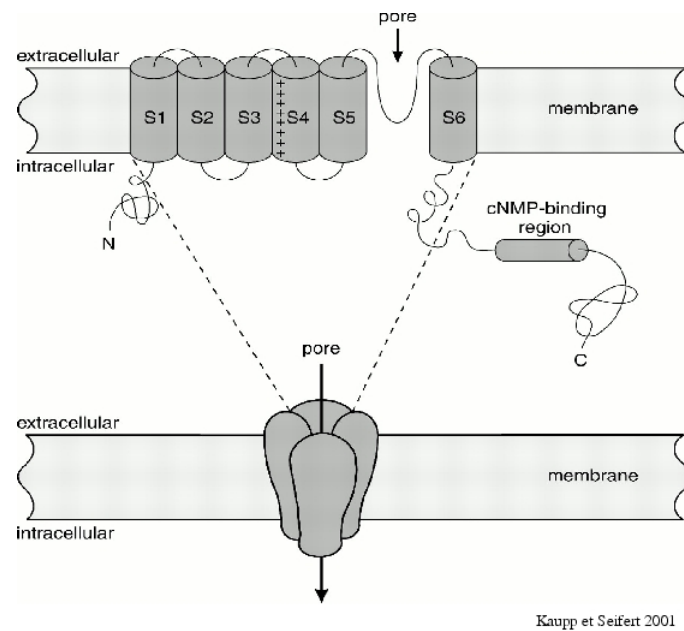


Fig. 2.4: Structures tertiaire et quaternaire de HCN

Les protéines HCN sont des membres de la superfamille des canaux potassiques avec 6 segments transmembranaires, dont le quatrième chargé positivement, est lié à la sensibilité aux changement de différence de potentiel, et un domaine P entre S5 et S6 participant à la formation du pore. Ils possèdent en outre un domaine de liaison aux nucléotides cycliques à l'extrémité N-terminal (structure tertiaire schématisée en haut). Les HCN forment des canaux ioniques sous forme de tétramère (structure quaternaire schématisée en bas). Figure tirée de [Kaupp and Seifert, 2001]

2.2.3 Hétéromérisations possibles des canaux HCN

Un nombre croissant de travaux indiquent que la formation de **canaux HCN hétéromères** est possible.

Quand on coexprime **HCN1 et HCN2** dans des systèmes hétérologues on observe un courant I_H dont les cinétiques, la sensibilité à l'AMPc et la courbe d'activation sont intermédiaires entre celles de HCN1 et de HCN2 exprimées seules, et que l'on ne peut pas rendre compte par simple sommation des deux courants. Les caractéristiques de ce nouveau courant I_H se rapproche d'ailleurs de celui mesuré dans des cellules qui co-expriment naturellement les deux isoformes comme les cellules pyramidales de CA1 [Chen et al., 2001b][Ulens and Tytgat, 2001].

Il a également été montré que la co-expression de **HCN1 et HCN4** produit un courant I_H distinct, qui se rapproche de celui mesuré dans les cellules du noeud sinoatrial [Altomare et al., 2003].

2.2.4 Modulation par les nucléotides cycliques

Depuis trente ans que l'on découvre des courants I_H dans une grande variété de tissu, on constate aussi une grande variété de propriétés électrophysiologiques (voir Tableau.2.1). La seule variété des canaux HCN ne suffit pas à rendre compte de cette diversité. Plusieurs phénomènes de modulation rentrent également en jeu.

La principale voie de modulation des courant I_H passe par l'AMPc. Cette modulation est indépendante de la PKA [Pedarzani and Storm, 1995], elle se produit sans phosphorylation [DiFrancesco and Tortora, 1991].

Domaine CNBD

On constate la présence d'un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD pour *cyclic nucleotid bindind domain*) à l'extrémité carboxyle de tout les isoformes HCN, mais également chez les canaux ouverts par les nucléotides cycliques CNG, chez les canaux EAG, et jusque chez le canal végétal KAT1. Tout ces canaux sont modulés par les nucléotides cycliques, mais de manières différentes. Les CNG sont ouverts par la liaison aux nucléotides cycliques. Les HCN sont seulement modulés, avec le cas particulier du spHCN d'oursins où l'AMPc empêche l'inactivation qui a lieu sinon.

Le CNBD est relié au domaine transmembranaire par un domaine appelé "C-linker". Des données de cristallographie sur le CNBD et son C-linker isolés de la partie trans-

membranaire du canal montre qu'en présence d'AMPc l'ensemble CNBD C-linker se tétramérise. Ce qui aurait pour effet de stabiliser l'état ouvert du canal et donc de décaler la courbe d'activation vers des valeurs plus positives. Quand il n'est pas lié à l'AMPc, le CNBD inhibe donc l'ouverture du canal [Wainger et al., 2001]. Dans le cas du spHCN, cette stabilisation réduirait la probabilité d'inactivation, ce qui explique que dans ce cas c'est la conductance maximale qui est augmentée en présence d'AMPc [Rosenbaum and Gordon, 2004][Shin et al., 2004].

Les différents isoformes HCN sont plus ou moins sensibles à l'AMPc. HCN1 et HCN3 sont peu sensibles tandis que HCN2 et HCN4 le sont beaucoup plus (voir Tableau.2.1). Ces différences de sensibilité sont liées à l'efficacité de l'inhibition du CNBD sur l'ouverture du canal [Wainger et al., 2001].

Complexité des voies de signalisation par l'AMPc et modulation de I_H

La modulation du courant I_H dépend donc de la concentration en AMPc intracellulaire qui est régulée par un grand nombre de voies de signalisation. L'importance fonctionnelle de la régulation du courant I_H via l'AMPc a été décrite dans plusieurs cas.

Voie de signalisation de l'AMPc L'AMPc est synthétisé par l'adénylate cyclase (AC), en général suite à l'activation d'un récepteur par un "premier messenger". L'AMPc constitue le **second messenger** de plusieurs voies de signalisation. Il est par ailleurs hydrolysé par la phosphodiesterase (PDE). *In fine* la concentration intracellulaire en AMPc est le résultat de l'équilibre dynamique entre synthèse et hydrolyse, lesquelles sont régulées par un réseau complexe de signalisation, avec de nombreuses boucles [Schwartz, 2001].

Dans l'hippocampe, des AC sensibles au Ca^{2+} (AC1, stimulée par Ca^{2+} seul ; AC8, stimulée par Ca^{2+} /calmoduline et AC9, inhibée par Ca^{2+} /calcineurine) et insensibles au Ca^{2+} (CA2 et CA4, vraisemblablement activée par la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine $G_{1\alpha}$) sont exprimées [Chern, 2000]. Chez les souris doubles KO AC1 et AC8, la LTP induite par activation des fibres moussues n'a quasiment plus lieu [Wong et al., 1999]. Chaque AC est exprimée dans des sous-compartiments cellulaires spécifiques. AC8 est exprimée au niveau des synapses excitatrices tandis que AC1 est non synaptique [Wang et al., 2003]. L'interaction entre PDE et AC localisée permet des variations compartimentalisées de la concentration en AMPc intracellulaire [Zaccolo et al., 2006]. Des variations localisées de l'AMPc intracellulaires en lien avec le calcium intracellulaire ont été démontrées dans des cellules cardiaques en suivant le changement d'efficacité de transfert d'énergie de Förster

au sein d'un indicateur de la concentration d'AMPc formé d'une PKA fusionnée à des protéines fluorescentes [Zaccolo and Pozzan, 2002].

Des mesures *in vitro* au niveau tissulaire de la quantité d'AMPc dans des tranches d'hippocampe ont été effectuées dans différentes conditions. L'activation des récepteurs NMDA, notamment par la stimulation des collatérales de Schaffer, induit une augmentation de l'AMPc. L'utilisation de 1 mM de NMDA triple la quantité de d'AMPc dans la région CA1. La stimulation des collatérales de Schaffer selon le même protocole que l'induction d'une LTP augmente de 50 % la quantité d'AMPc. Cette augmentation d'AMPc facilite l'ouverture des canaux calciques à haut-seuil. Il est probable que c'est l'augmentation de calcium intracellulaire provoquée par l'activation des récepteurs NMDA qui active la production d'AMPc. Celle-ci aurait un effet amplifiant en facilitant l'entrée supplémentaire de calcium. Aucune étude n'a montré si cette augmentation d'AMPc a un effet sur le courant I_H , ni quel type cellulaire exactement est concerné par cette augmentation d'AMPc, même s'il est très probable que cela soit les cellules pyramidales, cible des collatérales de Schaffer où l'on observe la facilitation des courants calciques à haut-seuil [Chetkovich et al., 1991]. L'activation des récepteurs β_1 -adrénergiques provoque aussi une augmentation de la quantité d'AMPc dans la régions CA1 [Vanhoose and Winder, 2003]. L'augmentation de la concentration en AMPc consécutive à l'activation des récepteurs NMDA ou des récepteurs β_1 -adrénergiques est potentialisée par l'activation simultanée des récepteurs α_2 -adrénergiques, un type de récepteur couplé aux protéines G (GPCR, pour *G protein-coupled receptor*). Par contre l'activation simultanée des récepteurs NMDA ou des récepteurs β -adrénergiques avec les récepteurs sérotoninergique $5HT_{1A}$, les récepteurs dopaminergiques D_2 ou les récepteurs $GABA_B$, d'autres GPCR, inhibe la production d'AMPc [Vanhoose et al., 2004]. La concentration d'AMPc intracellulaire est donc finement contrôlée par l'activité synaptique à travers les effets de différents neurotransmetteurs. Ces études ne mesurent que la quantité d'AMPc au niveau tissulaire. Elles ne peuvent pas discriminer entre les différents types cellulaires. Par ailleurs, l'effet de ces variations de quantité d'AMPc sur le courant I_H n'ont pas été décrites en dehors de l'effet de la sérotonine.

Quelques exemples de régulation de I_H par variation de la concentration en AMPc Dans les cellules du noeud sinoatrial, la noradrénaline active la production d'AMPc, ce qui accélère la cinétique de I_H , l'acétylcholine inhibe la production d'AMPc, ce qui ralentit la cinétique de I_H (Fig. 2.7).

Dans le système nerveux aussi nombreux sont les neurotransmetteurs qui plus ou moins directement provoquent dans certains types cellulaires des variations de la concentration intracellulaire d'AMPc qui modulent le courant I_H .

L'application d'opioïdes provoque une inhibition de I_H dans les interneurons du *stratum oriens* de CA1 (récepteurs au opioïdes de type Enkephalines). Celle-ci est indépendante de l'inhibition des courants entrants rectifiants couplés aux protéines G (GIRK). Elle passe donc certainement par l'activation d'AC via des protéines G [Svoboda and Lupica, 1998].

Le monoxyde d'azote NO provoque un décalage de la courbe d'activation de I_H vers des valeurs plus positives dans le neurones thalamocorticaux, certainement via l'activation de la voie de GMPc [Pape and Mager, 1992]. Dans les cellules relais thalamocorticales, l'augmentation du calcium intracellulaire pendant des épisodes d'activité oscillatoire active le courant I_H via la production d'AMPc. Cette activation du courant I_H finit par amortir les oscillations jusqu'à leur cessation [Bal and McCormick, 1996][Lüthi and McCormick, 1999].

Dans les terminaisons nerveuses motrices de l'écrevisse, l'activation de l'adénylate cyclase par la sérotonine active le courant I_H dans l'axone. On observe alors une amélioration de la force synaptique [Beaumont and Zucker, 2000].

Les cellules pyramidales de CA1 expriment différents types de récepteurs à la sérotonine qui ont des effets opposés sur le courant I_H : le récepteur sérotoninergique $5HT_{1A}$ décale la courbe d'activation vers des valeurs plus hyperpolarisées tandis que les récepteurs $5HT_4$ et $5HT_7$ la décalent vers des valeurs plus dépolarisées. Or $5HT_{1A}$ est localisé dans les dendrites alors que $5HT_4$ et $5HT_7$ sont localisés dans le soma. Il semble que les effets contradictoires de ces différents récepteurs sérotoninergiques sont dus à des régulations opposées de l'AMPc. On a avec un seul neurotransmetteur, mais plusieurs récepteurs, un outils fin pour réguler au niveau subcellulaire les propriétés du courant I_H [Bickmeyer et al., 2002]

Dans les cellules pyramidales de CA1, la bascule moléculaire au cours du développement depuis une expression majoritaire de HCN4 et HCN2 vers une expression majoritaire de HCN1 se fait parallèlement à une forte augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire. Le courant I_H mature est moins sensible à l'AMPc. Il s'agit d'un découplage au cours du développement entre la voie de signalisation de l'AMPc et le courant I_H [Surges et al., 2006].

2.2.5 Autres voies de modulation des courants I_H

Modulation par PIP2

La modulation des courants I_H par l'AMPC permet un décalage de la courbe d'activation jusqu'à +20 mV. Mais cela ne suffit pas pour rendre compte du décalage de +40 à +60 mV de la courbe d'activation observée après passage à un mode intérieur à l'extérieur (inside-out patches), ou après une dialyse longue du milieu intracellulaire en mode cellule entière. Deux publications indépendantes très récentes identifient le modulateur manquant comme étant un phospholipide connu dans les voies de régulation, le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2). Zolles et al. montrent que la wortmannin, un inhibiteur de la production de PIP2, décale la courbe d'activation du courant I_H vers des valeurs plus hyperpolarisées dans les neurones dopaminergiques de la substance noire (tronc cérébral) et dans les myocytes cardiaques embryonnaires. L'inhibition de la production de PIP2 a un effet désorganisateur sur la rythmogenèse des neurones dopaminergiques [Zolles et al., 2006]. Pian et al. montrent quant à eux que l'ajout de PIP2 décale la courbe d'activation du courant I_H vers des valeurs positives dans des oocytes de xénope exprimant HCN2. Les mêmes résultats sont obtenus dans les cellules du nœud sinusal de lapin [Pian et al., 2006].

Les courants I_H testés par ces travaux sont essentiellement conduits par des canaux composés de HCN2, que cela soit dans les neurones dopaminergiques de la substance noire (HCN2 majoritaire [Santoro et al., 2000]), ou dans les cellules cardiaques (qui expriment cependant aussi HCN1 et HCN4) ou dans le système hétérologue d'expression de HCN2. Nous n'avons pas d'indication sur les sensibilités des autres isoformes de HCN à PIP2. Un décalage de la courbe d'activation d'un courant I_H supérieur à 40 mV n'a été observé en condition physiologique que dans les myocytes ventriculaires pendant le développement postnatal [Pian et al., 2006]. Y a-t-il d'autres cas où la régulation du courant I_H par PIP2 joue un rôle clef? La présence quasi ubiquitaire de HCN2 dans le SNC le laisse penser.

Phosphorylation des isoformes HCN sur des sites tyrosine

Le premier clonage de HCN1 a été permis par l'interaction qui existe avec le domaine SH3 de la kinase src dans une stratégie de recherche en double hybride sur levure (yeast 2-hybrid screen) [Santoro et al., 1997]. Même si l'effet de l'AMPC sur les HCN n'est pas dû à une phosphorylation catalysée par la PKA, la modulation des propriétés électrophysiologiques du courant I_H par phosphorylation est possible. La phosphorylation de HCN2 et HCN4 par la formation d'un complexe avec la protéine tyrosine-kinase

src dans un système hétérologue (HEK293) décale la courbe d'activation (+13 mV pour HCN4, +2 mV pour HCN2) sans changer la conductance maximale et accélère la cinétique d'activation [Zong et al., 2005][Arinsburg et al., 2006]. Cette modulation du courant I_H par src a été observée dans les myocytes ventriculaires [Arinsburg et al., 2006], dans les cellules pacemaker du nœud sinusal et dans les neurones du ganglion de la racine dorsale [Zong et al., 2005].

Le site de phosphorylation consiste en une tyrosine dans le domaine "C-linker" (Y456 dans le HCN2 murin). Le site de reconnaissance de la kinase se répartit entre le CNBD et le C-linker et est très bien conservé dans tout les isoformes HCN. Tous sont donc potentiellement régulés par src [Zong et al., 2005]. La comparaison avec la structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie des domaines CNBD et C-linker indique que la phosphorylation provoquerait un déploiement du complexe tétramérique régulateur intracellulaire, lequel favoriserait l'ouverture du canal HCN [Zong et al., 2005]. L'effet de la phosphorylation est indépendant de la modulation par l'AMPc [Zong et al., 2005]. L'augmentation de la conductance observée dans les cellules du nœud sinusal pourrait être due à la phosphorylation d'un autre résidu tyrosine [Arinsburg et al., 2006].

L'expression ubiquitaire de src dans le système nerveux laisse penser que cette modulation peut se produire dans beaucoup plus de types cellulaires. La régulation de la protéine kinase src implique un réseau complexe de voies de signalisation (Ras, ephrinB, cytokine, intégrines par exemple). La sous-unité $G_{\alpha S}$ stimule directement src. Sachant que la régulation du niveau d'AMPc est souvent régulé par des voies impliquant les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), on aurait là un moyen de régler finement les propriétés électrophysiologiques des courants I_H .

Interaction avec d'autres protéines

MiRP1 La protéine MiRP1 agit sur les canaux constitués de HCN2 comme une sous-unité β . Elle inhibe la composante I_H du courant et augmente la composante instantanée I_{inst} , ce qui revient à transformer le courant I_H en un courant de fuite [Proenza et al., 2002].

Interactions avec des protéines d'échafaudage Une interaction entre la partie C-terminale de HCN1 et la protéine **TRIP8b** a été identifiée : elles co-précipitent et co-localisent, notamment dans les cellules pyramidales de CA1 et de la couche 5 du néocortex. La co-expression de TRIP8b avec HCN1 dans un système hétérologue fait quasiment disparaître le courant I_H . Elle le réduit aussi très fortement quand elle est co-exprimée avec HCN2. Cette interaction intervient surtout dans l'adressage à la membrane.

La diminution de conductance observée est certainement due à une rétention des canaux dans des vésicules. Cette interaction peut donc jouer un rôle dans la régulation de la distribution des protéines HCN, comme le gradient somato-dendritique de HCN1 observé chez les cellules pyramidales, ou bien dans une régulation de type équilibre dynamique où une population de HCN serait en attente à proximité de la membrane dans des vésicules pour faire varier la densité de courant [Santoro et al., 2004].

La filamin A, protéine d'échafaudage liant l'actine, interagit avec HCN1 par un domaine en aval du CNBD qui n'est pas présent chez les autres isoformes HCN. La courbe d'activation du courant I_H est fortement accélérée en présence de filamin A. La présence de la filamin A modifie la localisation de HCN1 à la membrane. Là aussi la filamin A peut être responsable de l'adressage spécifique de HCN1 à la membrane comme le gradient somato-dendritique [Gravante et al., 2004].

Il a été aussi montré que HCN2 pouvait interagir avec de nombreuses autres protéines d'échafaudage : la **talamin**, **S-SCAM** et **Mint2**. Les sites d'interaction sont distincts pour chacune de ces protéines. La talamin est déjà connue pour interagir avec un motif de liaison PDZ des mGluR1 et 2 [Kimura et al., 2004].

2.2.6 Pharmacologie du courant I_H

bloqueurs

La recherche de bloqueurs des courant I_H est encouragée à la fois par l'étude du rôle d'un courant aussi ubiquitaire, et par l'espoir de développer des molécules thérapeutiques afin de traiter des dysfonctionnements du rythme cardiaque. C'est pourquoi la pharmacologie des courants I_H est associée au traitement des rythmes cardiaques.

Le **césium extracellulaire** est un bloqueur bien connu des courants I_H . Mais il agit également sur des courants potassiques comme les I_{KIR} . Le strontium extracellulaire bloque aussi I_H dans les cellules cardiaques [Ono et al., 1994], mais il n'a jamais été utilisé, ni en recherche ni en clinique. Son intérêt est plus dans la compréhension de la biophysique de l'ouverture du canal.

Le bloqueur de I_H le plus utilisé est le **ZD7288** (ZENECA, 4-(N-ethyl-N-phenylamino)-1,2-diméthyl-6-(méthylamino) pyridinium chloride) [BoSmith et al., 1993][Harris and Constanti, 1995]. Il est suffisamment spécifique : à $1 \mu M$, le courant I_H est réduit de 82% tandis que le courant calcique l'est seulement de 18 % et le courant potassique retardé d'environ 1 %. Il provoque un décalage de la courbe d'activation vers des valeurs plus négative (16 mV), et une forte diminution de la

conductance maximale. L'effet du ZD7288 semble indépendant de l'état d'ouverture du canal. Mais il est néanmoins lent (de l'ordre d'une dizaine de minute), laissant penser qu'il agit par le côté cytoplasmique de la membrane [Baruscotti et al., 2005]. Son utilisation est cependant critiquée car il a été rapporté que pour des concentrations supérieures à $50 \mu M$ il inhibe la transmission synaptique dans les fibres moussues de l'hippocampe et dans les fibres parallèles du cervelet de manière présynaptique et indépendamment de son effet sur I_H . Le même effet a été démontré pour un autre bloqueur de I_H , le DK-AH 269 [Chevalleyre and Castillo, 2002]. De nombreuses études ont néanmoins utilisées le ZD7288 comme bloqueur de I_H . En particulier Maccaferri & McBain ont montré que le ZD7288 ne change pas la forme des potentiels d'actions, donc qu'il n'y a pas d'effet de ZD7288 hors des potentiels où I_H est actif [Maccaferri and McBain, 1996]. Aponte et al. montrent par ailleurs qu'il n'y a pas d'effet de I_H sur le décours temporel de PPSI miniatures produits par les cellules paniers du gyrus denté sur les cellules granulaires [Aponte et al., 2006]. Enfin notre propre expérience (dans l'équipe de Dominique Debanne) indique qu'utilisé à faible concentration ($1 \mu M$) le ZD7288 ne provoque aucun changement sur l'efficacité de la transmission synaptique, notamment dans le cadre de test de la LTP (Émilie Campanac), et dans des enregistrements de PPS unitaires avec des paires (Sami Boudkkazi).

D'autres composés organiques ont été découverts pour bloquer le courant I_H , particulièrement dans le cadre de la recherche de drogue pour réguler les rythmes cardiaques. Un agent bradycardiaque spécifique comme l'alinidine s'est avéré être un bloqueur de I_H . Il agit en décalant la courbe d'activation vers des valeurs plus négatives. Il est cependant peu spécifique et inhibe des courants potassiques. L'**ivabradine** (S 16257-2) est un agent ralentissant la fréquence (rate-reducing agent). Elle inhibe le courant I_H avec une bonne spécificité. Plus le potentiel de membrane est souvent hyperpolarisé, plus son action est efficace, ce qui indique un bloqueur du canal ouvert ("open-channel" blocker) [Gardiner et al., 1995] [Bucchi et al., 2006] [Baruscotti et al., 2005]. La **zatebradine** et la cilobradine réduisent la conductance maximale du courant I_H sans avoir aucun effet sur la courbe d'activation. Il s'agit aussi de bloqueurs du canal ouvert. Ils présentent une spécificité relativement bonne. Son utilisation clinique comme ralentisseur du rythme cardiaque est envisagée, mais se heurte à des effets secondaires dans la rétine (perte d'accommodation) [Baruscotti et al., 2005]. Très récemment, il a été montré que la clonidine a un effet bradycardiaque en inhibant les courants I_H produits par HCN2 et HCN4 [Knaus et al., 2007].

Il semble nécessaire de vérifier systématiquement si ces produits potentiellement intéressants pour des applications en cardiologie ne provoqueraient pas des effets secondaires au niveau neurologique (épilepsie, trouble du sommeil, de l'attention, de la mémoire...) comme c'est déjà le cas pour la zatebradine au niveau de la perception vi-

suelle.

effet des anesthésiques :

On est également en train de découvrir un nombre croissant d'anesthésique agissant sur les propriétés électrophysiologiques de I_H .

Des composés halogénés comme l'**halothane** provoquent une inhibition du courant I_H porté par des canaux HCN1 et HCN2 exprimés dans des neurones corticaux. La courbe d'activation du courant porté par HCN1 est décalée vers des valeurs plus hyperpolarisées et le courant maximal porté par HCN2 est plus faible après inhalation de cet anesthésique à des doses cliniques. Dans des cas de canaux hétéromériques, l'inhibition passe par ces deux mécanismes [Chen et al., 2005b].

Le **propofol**, un anesthésique organique administré par perfusion, inhibe la composante rapide du courant I_H dans les cellules pyramidales néocorticales . Il n'a aucun effet sur le courant I_H porté par des canaux homomériques HCN2, mais décale la courbe d'activation vers des valeurs plus hyperpolarisées et diminue la valeur maximale de courant disponible pour des courants I_H portés par des canaux homomériques HCN1 ou hétéromériques HCN1-HCN2 [Chen et al., 2005a]. Le propofol a un effet sur HCN1, HCN2 et HCN4 quand ils sont exprimés dans des oocytes de xénope. Il diminue le rythme cardiaque dans une préparation isolée de coeur de cochon d'inde [Cacheaux et al., 2005]. L'inhibition du courant I_H par le propofol provoque une diminution de la régularité et de la fréquence des oscillations Δ dans les neurones relais thalamocorticaux du complexe ventrobasal [Ying et al., 2006].

Ces modulations du courant I_H par des anesthésiques peuvent expliquer plusieurs effets des anesthésiques, recherchés comme l'inhibition de l'activité thalamocorticale, non désirés comme la bradycardie ou l'hyperexcitabilité occasionnelle peu de temps avant l'endormissement.

2.3 Patrons spatio-temporels d'expression des gènes HCN dans le SNC

Des études électrophysiologiques ont identifiées la présence de courants I_H dans de nombreux tissus dont voici une liste non exhaustive :

- Tissus cardiaques [DiFrancesco, 2006] (en particulier, les cellules du nœud sinusal [Noma and Irisawa, 1976][Brown et al., 1979][DiFrancesco et al., 1986], les fibres

- de Purkinje [DiFrancesco, 1981b][DiFrancesco, 1981a], les muscles ventriculaires [Yu et al., 1993])
- neurones périphériques [Mayer and Westbrook, 1983]
- récepteurs sensoriels (récepteurs gustatifs, photorécepteurs - cônes et bâtonnets, récepteur de la tension des homard...[Robinson and Siegelbaum, 2003])
- neurones centraux [Pape, 1996]

Les caractéristiques cinétiques et la sensibilité à l'AMPc des courants I_H dans ces différents types cellulaires sont très variés (voir Tableau.2.2). Ce qui correspond à une distribution différenciée de chaque isoforme de HCN.

2.3.1 Patron d'expression des différentes isoformes HCN à l'état adulte dans le SNC mammifère

Le clonage des gènes HCN a permis de mieux préciser la distribution des courants I_H , en lien avec la transcription des ARN messagers (ARNm) HCN et la présence à la membrane de protéines HCN accessibles à des anticorps spécifiques. Nous allons ici nous concentrer sur la distribution des protéines HCN dans le SNC, spécialement dans les structures corticales.

On détecte la transcription des gènes HCN dans toutes les structures du système nerveux central des mammifères, mais avec des patrons d'expression différents pour chaque isoforme.

Chez le rat et la souris, HCN2 et HCN3 sont exprimées de manière quasi ubiquitaire, HCN3 généralement plus faiblement que HCN2. HCN1 est exprimée plus spécifiquement dans les structures corticales, et HCN4 surtout dans les structures sous-corticales [Santoro et al., 2000][Bender et al., 2001]. HCN1 est absente du thalamus qui exprime HCN2 à un haut niveau et HCN4 de manière notable. Le cervelet au contraire exprime surtout HCN1, HCN2 à un faible niveau et de manière localisée. HCN4 y est quasiment absente. Ces différences de patron d'expression des différentes isoformes sont corrélées aux différences de propriétés des courants I_H exprimés. Les courants I_H observés dans le cervelet ont une cinétique d'activation rapide et sont peu sensible à l'AMPc tandis qu'ils sont plus lents et fortement modulés par l'AMPc dans le thalamus [Santoro et al., 2000].

De même les cellules dopaminergiques de la substance noire et les cellules relais thalamo-corticales qui n'expriment pas HCN1, mais les trois autres isoformes, ont des cinétiques nettement plus lente que les cellules pyramidales de CA1 et de la couche 5 du néocortex qui expriment surtout HCN1 et HCN2 et nettement moins HCN3 et HCN4 (Figure. 2.5) [Franz et al., 2000].

Aucune HCN n'est présente dans la matière blanche comme le corps cal-leux, ce qui confirme une localisation essentiellement neuronale des HCN [Monteggia et al., 2000].

Les études de la distribution moléculaire des isoformes HCN ont révélés leur présence là où le courant I_H est déjà connu électrophysiologiquement (thalamus, hippocampe, cervelet...), mais aussi là où il n'avait pas été détecté. Des études ultérieures montrèrent que son expression peut-être cachée par d'autres courants, notamment potassiques, et que l'on a besoin d'une étude plus fine pour démontrer son expression électrophysiologique [Monteggia et al., 2000][Rateau and Ropert, 2006][Aponte et al., 2006].

Distribution des gènes HCN dans le néocortex et l'hippocampe

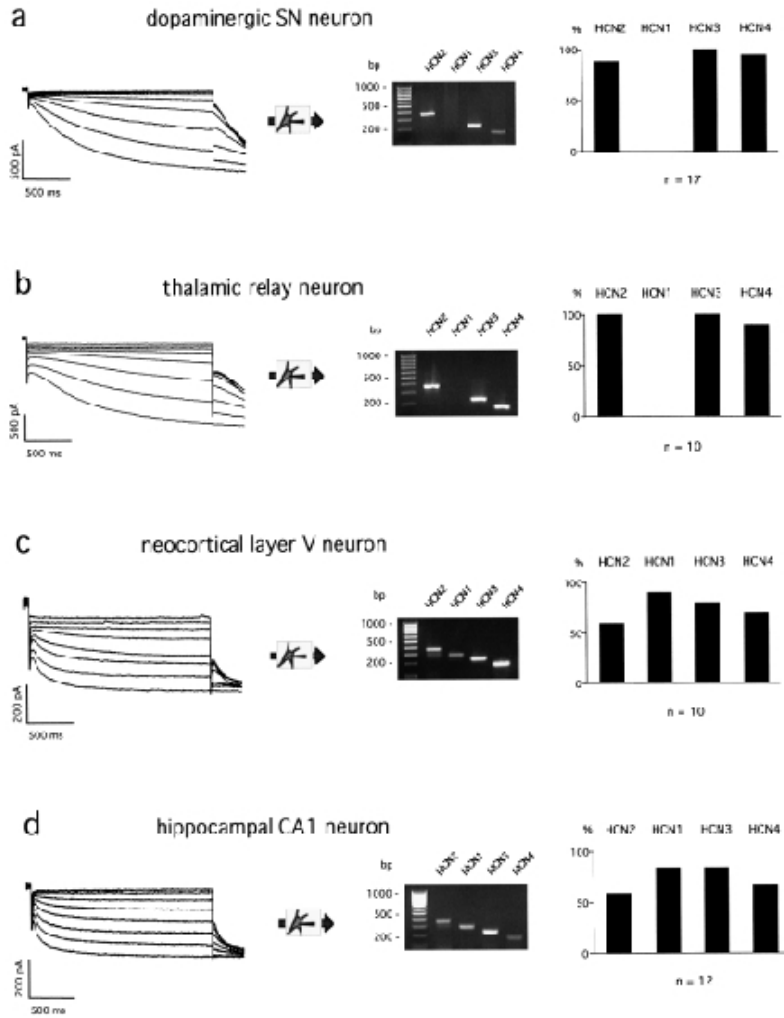
HCN1 et HCN2 sont exprimées dans les structures corticales à un niveau modéré et HCN4 est quasi absente au stade adulte.

Dans le néocortex, HCN1 est surtout exprimée dans les couches superficielles à partir de la couche 5 (gradient somato-dendritique dans les pyramidales de la couche 5). L'expression de HCN2 y est plus homogène, aussi bien dans les petits et les grands neurones [Bender et al., 2001][Monteggia et al., 2000].

Dans l'hippocampe, HCN1 est surtout exprimée dans la région CA1. Chez le rat adulte, elle est absente de la région CA3 [Bender et al., 2001], elle y est faiblement exprimée chez la souris [Santoro et al., 2000]. Inversement, HCN2 est plus fortement exprimée dans la région CA3 que dans la région CA1, et est exprimée à très faible niveau dans le gyrus denté. Une faible expression de HCN4 est observable dans la région CA3.

Chez l'humain, HCN1 est exprimée au niveau des corps cellulaires des cellules principales dans toutes les structures hippocampales, particulièrement dans le *stratum pyramidale* de CA1. HCN2 est exprimée plus faiblement à travers l'hippocampe [Bender et al., 2003].

Patron d'expression HCN dans les interneurones Les grands interneurones du *stratum oriens*, vraisemblablement des cellules paniers, expriment principalement HCN1 [Santoro et al., 2000]. HCN1 et HCN2 sont exprimées dans les **interneurones à parvalbumine** à l'exclusion stricte des **interneurones à cholecystokinine** (CCK). On y observe notamment une expression axonale [Bender et al., 2005]. HCN4 est exprimée dans les soma des deux types de cellules-paniers. Ce patron d'expression est cohérent avec les signatures électrophysiologiques des deux sous-populations. Les interneurones à parvalbumine sont à décharge rapide. Les canaux HCN dans les termi-



Franz et al. 2000

Fig. 2.5: Courants I_H et isoformes HCN exprimés dans différents types de neurone Réponse à des créneaux croissants de potentiel hyperpolarisé à gauche ; mesure de la quantité de mRNA exprimé (RT-mPCR) à droite : A) dans les cellules dopaminergiques de la substance noire ; B) dans les cellules relais thalamocorticales C) dans les neurones néocorticaux de la couche 5 D) et dans les neurones hippocampaux de CA1.

[Franz et al., 2000]

naisons axonales y facilitent la probabilité et la régularité de libération de neurotransmetteur. Les interneurons à CCK sont incapables sans accommodation d'atteindre des fréquences de décharge de l'ordre de 100Hz comme les interneurons à parvalbumines [Brewster et al., 2006][Bender et al., 2001]. L'expression dispersée de HCN2 laisse penser que les plus petits interneurons du *stratum oriens*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum* et dans le hylus du gyrus denté (c'est à dire les interneurons des couches polymorphes) expriment principalement HCN2 [Santoro et al., 2000]. Les interneurons à la limite entre *stratum oriens* et *alveus* (interneurons O/A) ont un niveau d'expression de HCN2 et HCN4 particulièrement haut.

Ces différences de répartition ont des implications physiologiques. Les interneurons O/A ont été reconnu pour générer des rythmes et avoir des projections GABAérgique inhibitrices sur les pyramidales de CA1. HCN2 et HCN4 ont des cinétiques lentes, mais fortement modulables par l'AMPc, ce qui en fait des boutons de réglage de fréquence idéaux. Ces deux isoformes sont déjà connus pour être impliqués dans la génération de rythme dans le thalamus. Les grands interneurons paniers et chandeliers exprimant la parvalbumine ont un patron de décharge à haute fréquence, et très rarement des courants oscillatoires. Leur fonction doit être analogue à celle décrite pour les cellules paniers du cervelet, à savoir la régulation fréquentielle par inhibition tonique des cellules principales [Bender et al., 2001].

Patron d'expression HCN dans les cellules pyramidales Les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe et celles de la couche 5 du néocortex présentent un gradient croissant de densité de courant I_H sur l'axe somato-dendritique. La densité de courant I_H d'une cellule pyramidale de la région CA1 est six fois moindre dans le soma que dans les dendrites 350 μm plus loin [Magee, 1998]. De même la densité du courant augmente linéairement dans les dendrites avec la distance au soma (9 pA/100 μm) [Berger et al., 2001].

L'expression de HCN1 dans les cellules pyramidales suit le même gradient croissant que la densité de courant I_H dans la région CA1 [Lörincz et al., 2002] [Brewster et al., 2006] et dans le néocortex [Lörincz et al., 2002] [Notomi and Shigemoto, 2004]. HCN1 est fortement exprimée dans les épines dendritiques. (Fig.2.6) Ce gradient d'expression ne concerne pas HCN2 [Brewster et al., 2002][Vasilyev and Barish, 2002]. La courbe d'activation du courant I_H dans les dendrites est sensiblement décalée vers des valeurs plus négatives (-10 mV ; voir Tableau.2.2, et Fig.2.6). Néanmoins ses constantes de temps d'activation et de désactivation restent semblable. Il a été donc interpréter que la différence de la courbe d'activation serait plutôt due à une différence du niveau de modulation, notamment par l'AMPc.

La mise en place du gradient croissant d'expression de HCN1 sur l'axe somato-dendritique est très précoce dans les cellules pyramidales : dès P2 on observe l'expression de HCN1 et son transport vers les dendrites [Vasilyev and Barish, 2002].

Nous verrons que ce gradient a des conséquences fonctionnelles dans l'intégration dendritique.

Très récemment, un nouveau type de neurone, ayant la même morphologie que les cellules pyramidales, a été trouvé dans le stratum radiatum de CA1. Ils ont été nommé PLP (pour *pyramidal-like principal neurone*). Les neurones PLP expriment un gradient de densité de courant I_H inverse des autres cellules pyramidales, décroissant en s'éloignant du soma dans les dendrites [Bullis et al., 2006].

2.3.2 Patron d'expression des différentes isoformes HCN pendant le développement

Un nombre croissant d'études indique combien les propriétés électrophysiologiques des neurones évoluent au cours du développement. L'évolution des propriétés des courants I_H participe à ces changements.

De manière générale, chez les rongeurs, la densité de courant I_H augmente dans tout les types cellulaires au cours du premier mois. Dans la couche IV du cortex entorhinal de rat, la densité de courant I_H augmente dans les cellules étoilées de manière continue pendant les 4 premières semaines. Dans les cellules pyramidales, elle augmente jusqu'à un maximum au cours de la deuxième semaine [Richter et al., 1997]. Dans les cellules pyramidales de CA1 de rat, l'amplitude de courant I_H augmente de trois à quatre fois au cours des deux premières semaines [Surges et al., 2006] .

L'analyse fine des propriétés électrophysiologiques des courants I_H et de la composition protéique des canaux HCN décrit un patron d'expression spatio-temporelle des isoformes HCN plus compliqué. On assiste essentiellement à une bascule moléculaire depuis des courants I_H à cinétique lente et très sensibles à l'AMPc, conduits par des canaux constitués de HCN4 et HCN2, vers des courants I_H à cinétique rapide et moins sensibles à l'AMPc, conduits par des canaux où HCN1 domine.

Au stade néonatal, HCN4 est la principale isoforme exprimée, fortement dans les cellules pyramidales de la région CA1, plus faiblement dans les cellules principales de la région CA3 et du gyrus denté [Brewster et al., 2006].

Pendant les deux premières semaines, la cinétique du courant I_H des cellules pyramidales de CA1 s'accélère et sa sensibilité à l'AMPc diminue. La densité de courant (conductance

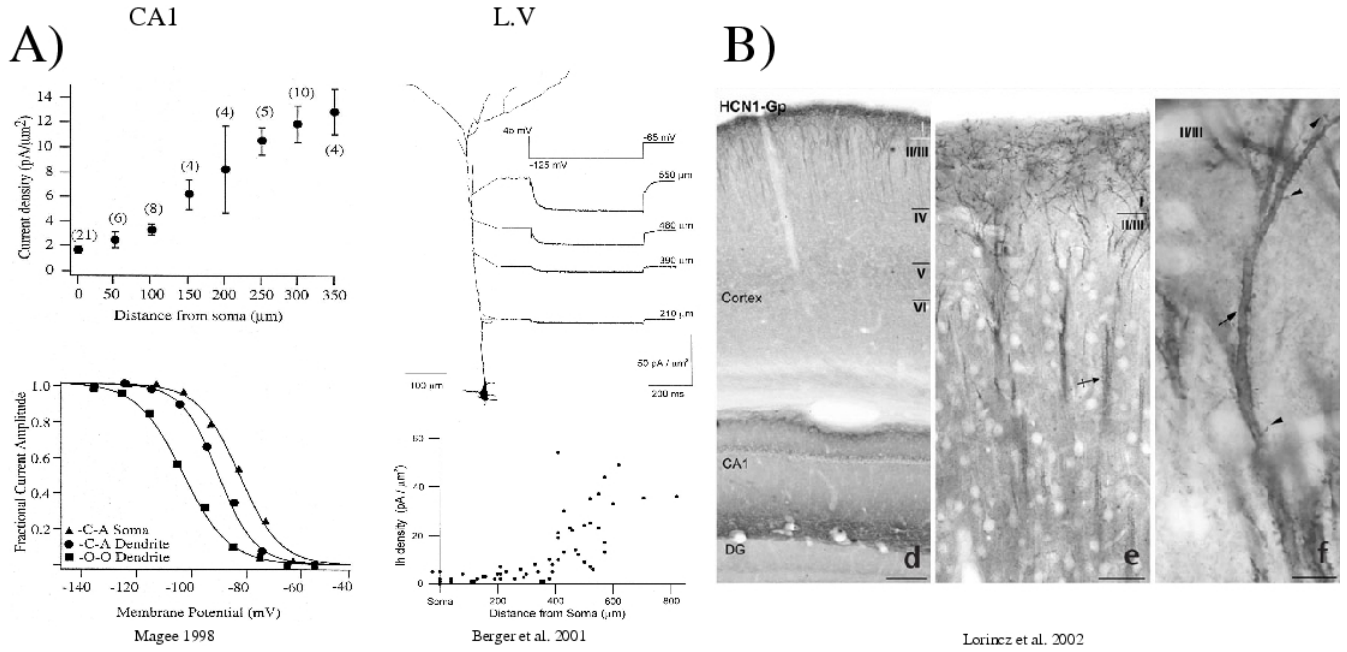


Fig. 2.6: Gradient croissant de la densité de courant I_H et de la concentration en canaux HCN1 dans les cellules pyramidales

A) Courant I_H mesuré le long de l'axe somato-dendritique dans les cellules pyramidales de CA1 [Magee, 1998] et de la couche 5 du néocortex [Berger et al., 2001]. La densité de courant augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne du soma. La courbe d'activation du courant I_H est décalée vers des valeurs plus négatives dans les dendrites, encore plus en enregistrement "inside/out".

B) Marquage immunologique de HCN1 dans le néocortex et l'hippocampe de rat. On voit une densité optique croissante plus on s'éloigne des couches des corps cellulaires le long des dendrites aussi bien dans le néocortex (en haut) que dans le CA1 de l'hippocampe (en bas). Au niveau subcellulaire, on remarque un marquage sur les épines dendritiques (à droite). [Lörincz et al., 2002]

ramenée à la capacitance) atteint un maximum au dixième jour postnatal (4,3pA/pF) puis diminue légèrement (3 pA/pF à l'état adulte) même si l'amplitude de courant continue d'augmenter du fait de la croissance cellulaire. La courbe d'activation du courant I_H se déplace vers des valeurs plus dépolarisées (+2,0 mV) et sa pente devient plus douce [Vasilyev and Barish, 2002]. Au niveau moléculaire, on observe une augmentation de l'expression de HCN1 et une diminution de l'expression de HCN4.

L'expression de HCN4 reste relativement constante dans la région CA3 et dans le gyrus denté, mais sa part relative dans la population totale des canaux HCN diminue [Surges et al., 2006]. La densité de courant dans les cellules pyramidales de CA3 reste toujours inférieure à celle mesurée dans les pyramidales de CA1. Elle atteint un maximum à P5, puis diminue aussi jusqu'à un peu moins de 1 pA/pF. La courbe d'activation se décale beaucoup plus que dans les cellules pyramidales de CA1 (+7,7 mV) et sa pente devient plus raide [Vasilyev and Barish, 2002]. L'expression de HCN1 augmente aussi dans les cellules pyramidales de CA3 jusqu'à un maximum à la deuxième semaine, puis régresse en faveur de HCN2 pour atteindre le niveau adulte [Brewster et al., 2006].

Selon les études, on observe un niveau constant d'expression de HCN2 dans toutes les cellules pyramidales [Bender et al., 2001], ou bien une forte augmentation de son niveau d'expression pendant les deux premières semaines [Brewster et al., 2006]. Dans tout les cas, HCN2 devient le composé majoritaire dans les cellules pyramidales de CA3 à l'âge adulte de par la disparition de HCN4 puis de HCN1 [Bender et al., 2001]. Son expression dans les pyramidales et dans les interneurons commence dans le soma, puis tardivement, à partir de P11, apparaît dans les dendrites [Brewster et al., 2006].

L'expression de canaux HCN dans les interneurons est plus tardives que dans les pyramidales. Certains interneurons de CA3 expriment HCN1 dès P3; les interneurons du gyrus denté et de CA1 plus tard. [Bender et al., 2005].

Pendant le développement, on assiste donc à une régulation étroite et indépendante de l'expression de chaque isoforme HCN, en fonction du temps, de la région hippocampale, du type cellulaire et du sous-compartiment cellulaire. La possibilité d'une expression si précise pendant le développement, laisse penser que des changements de distribution restent possibles pendant toute la vie, notamment pour des processus de plasticité.

2.3.3 Plasticité de l'expression des protéines HCN

Expressions pathologiques des HCN liées à l'épilepsie

Un nombre croissant d'étude indique des patrons d'expression des protéines HCN spécifiquement liées à des réseaux neuronaux sujets à des oscillations synchronisées pathologiques de type épileptique. Le débat reste néanmoins ouvert si ces patrons d'expression anormaux sont la cause ou la conséquence de l'épilepsie [Poolos, 2004].

Épilepsie du lobe temporal chez l'humain Chez des sujets humains atteint d'épilepsie du lobe temporal (qui concerne surtout l'hippocampe), on observe à la fois une forte mort cellulaire dans les couches des cellules principales de l'hippocampe et une surrégulation de HCN1. Il est difficile d'établir une modification du niveau d'expression de HCN2. Cette surexpression de HCN1 est probablement due à la diminution des afférences inhibitrices touchées par la mort cellulaire. Le changement de propriété du courant I_H pourrait ici être la cause de la synchronisation pathologique des décharges de réseau [Bender et al., 2003].

Modèles génétiques du petit mal Dans plusieurs modèles génétiques, une expression anormale de HCN a été reliée à des oscillations synchronisées pathologiques de type épileptiques. Des souris dont l'expression de HCN2 a été supprimée (KO de HCN2) présentent des crises spontanées d'absence [Ludwig et al., 2003]. Le modèle de rat "WAG/Rij" (*Wistar Albino Glaxo, élevé à Rijswijk*) utilisé pour l'étude des crises d'absence, présente un niveau d'expression de HCN1 dans le néocortex inférieur à celui observé dans une souche contrôle. Par contre l'expression de HCN1 est surrégulée dans les neurones relais thalamocorticaux où la courbe d'activation du courant I_H est décalée vers des valeurs hyperpolarisées. Ces derniers ont tendance à générer des oscillations typiques des crises d'absence (spike-wave discharges) [Ludwig et al., 2003][Budde et al., 2005]. La diminution de l'expression de HCN1 dans ce modèle de rat épileptique est innée et non acquise. Elle concerne d'abord les dendrites apicales. Cette diminution de la densité de courant dans les dendrites a plusieurs conséquences sur les capacités d'intégration dendritique de ces neurones : perte de la discrimination temporelle dans une série de PPSE consécutif, abaissement du seuil de déclenchement des potentiels d'action calciques [Kole et al., 2007].

Épilepsie développementale induite par la crise fébrile Un épisode de crise fébrile chez l'enfant augmente fortement le risque de développer des crises épileptiques à l'âge adulte. Chez les modèles animaux développés pour étudier la mise en place de réseaux

épileptiques en lien avec une crise fébrile pendant le développement, on observe dans l'hippocampe une augmentation paradoxale de l'excitabilité et de l'inhibition GABAérgique. Ceci s'explique par les changements à long terme des propriétés du courant I_H dans les cellules pyramidales de CA1 suite à l'induction d'épilepsie par une crise fébrile : un décalage de la courbe d'activation vers des valeurs plus positives (+3,3 mV), une plus forte amplitude de courant, un ralentissement des cinétiques d'activation et de désactivation. Ces changements sont conservés même après neuf semaines. Ils sont indépendants de l'AMPC et de PKA [Chen et al., 2001a]. Ces changements de propriétés électrophysiologiques correspondent à des modifications transcriptionnelles : une diminution de l'expression de HCN1 dans la région CA1 et une augmentation de l'expression de HCN2 dans les régions CA1 et CA3. Ces modifications transcriptionnelles sont causées par la crise fébrile et non par l'hyperthermie [Brewster et al., 2002]. Il a été de plus démontré que la surrégulation de l'expression de HCN2 et la sous-régulation de HCN1 favorise la formation de canaux hétéromère HCN1/HCN2. En effet suite à une crise fébrile, le rapport des niveau d'expression de HCN2 sur HCN1 double (de 0,12 à 0,24) ce qui augmente la probabilité de formation de canaux hétéromériques [Brewster et al., 2005].

Épilepsie chronique Le cortex entorhinal fournit la principale excitation des neurones de CA1 et du subiculum pendant l'épilepsie chronique. Or l'induction de crise par injection de kainate dans le cortex entorhinal de rat adulte provoque la mise en place de crise chronique d'épilepsie après une période de latence de quatre à cinq semaines. Vingt-quatre heures après l'injection de kainate, on observe une augmentation de l'activité spontanée du cortex entorhinal, liée à une forte réduction du courant I_H et de l'expression de HCN1 et HCN2 dans les cellules pyramidales de la couche III. Cette réduction est encore présente une semaine après la première crise. La relative précocité et la position en amont du circuit à l'origine des oscillations de cette réduction du courant I_H plaide ici en faveur de la thèse de I_H comme cause de l'épilepsie [Shah et al., 2004].

I_H cause et/ou conséquence de l'épilepsie À voir la variété des types d'épilepsie où l'expression de I_H change et la variété des structures concernées, il est aussi possible que I_H soit à la fois cause et conséquence de l'apparition de réseau épileptique. Dans le cortex entorhinal et dans les cellules relais thalamocorticales, il semble plus probable que I_H soit cause : la perturbation de l'expression des gènes HCN1 et HCN2 facilitent l'apparition de crise d'absence et l'augmentation de l'excitabilité dans le cortex entorhinal pourrait être la première étape de la sur-synchronisation du réseau qui se propagera vers l'hippocampe dans le cas de l'épilepsie chronique. Par contre dans l'hippocampe, les modifications de l'expression de I_H semblent bien être des conséquences de la perturbation des propriétés du réseau comme la mort cellulaire dans le cas de l'épilepsie du lobe temporal et l'épilepsie

induite par crise fébrile.

Plasticité de l'expression des protéines HCN : mécanisme de régulation homéostatique

Les changements d'expression des protéines HCN dans différents modèles d'épilepsie semblent paradoxaux. Il y a dans certains cas surrégulation (épilepsie de lobe temporal chez l'homme, épilepsie induite par crise fébrile...) et dans d'autres cas sous-régulation (phase de latence de l'épilepsie chronique induite par injection de kaïnate, modèle du petit mal...). Une manière de résoudre ce paradoxe apparent est de considérer ces changements d'expression de certaines isoformes HCN comme autant de mécanismes de régulation homéostatique. Les uns pouvant être causes de l'épilepsie, les autres pouvant être conséquences.

Par ailleurs la section de la voie perforante originaire du cortex entorhinal sur les cellules pyramidales de CA1 et sur les cellules granulaires du gyrus denté provoque une importante diminution de l'expression de HCN1, et donc une diminution du courant I_H , sans changer le niveau d'expression des autres isoformes HCN [Bräuer et al., 2001]. Un tel phénomène indique que chaque isoforme HCN est une cible indépendante de plasticité neuronale [Santoro and Baram, 2003].

La plasticité de l'expression de protéines HCN a été mise en évidence dans le modèle de potentialisation à long terme (LTP) induite par stimulation à fréquence θ des collatérales de Schaffer. Il s'y produit une diminution de l'excitabilité cellulaire due à une augmentation de la conductance I_H suite à une augmentation de l'expression de protéines HCN1 [Fan et al., 2005]. Cependant un protocole de plasticité moins massif de potentialisation à long-terme des synapses par décharge appariée induit une diminution locale de la conductance I_H [Campanac et al., 2007]. Ces résultats apparemment contradictoires indiquent néanmoins qu'une plasticité de l'expression des protéines HCN ont lieu dans un contexte de plasticité de l'excitabilité cellulaire à l'état adulte.

2.4 Fonctions

Les courants I_H sont impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques [Robinson and Siegelbaum, 2003] : le contrôle de l'activité rythmique au niveau cellulaire dans le cœur et dans le système nerveux [Robinson et al., 2006][Lüthi and McCormick, 1998a], la définition du potentiel de repos de plusieurs types de neurones, la participation à la résistance de mem-

Cell type	E_{rev} (mV)	$V_{\frac{1}{2}}$ (mV)	k	τ_{slow}	τ_{fast}	@ (mV)	Source
noeud sinoatrial de lapin (I_f)		-62,5	9,6				[Altomare et al., 2003]
pyr. CA1	P1	-94,0	7,9	4000	600	-90	[Vasilyev and Barish, 2002]
	P20	-92,0	10,4	2000	150	-90	[Vasilyev and Barish, 2002]
pyr. CA3	P1	-93,4	10,3	8000	600	-100	[Vasilyev and Barish, 2002]
	P20	-85,7	8,5	3000	200	-100	[Vasilyev and Barish, 2002]
pyr. CA1 Soma	-2	-82	8,8	17	-	-120	[Magee, 1998]
pyr. CA1 Dendrite	+1	-90	8,5	20	-	-120	[Magee, 1998]
IN O/A CA1	-30	-84,1	10,2	1 040	186	-120	[Maccaferri and McBain, 1996]
cellules étoilées, couche II cortex entorhinal	-22	-77,5	11,2	372	78	-70	[Dickson et al., 2000]
neurones septo-hippocampaux GABAergiques	-40	-98	-	194	-	?	[Xu et al., 2004]

Tab. 2.2: Paramètres électrophysiologiques des courant I_H dans différents contextes cellulaires

brane, l'intégration dendritique, la régulation de la transmission synaptique [Lupica et al., 2001] [Aponte et al., 2006] [Southan et al., 2000] [Aponte et al., 2006] [Yasui et al., 2005], le soutien à une haute fréquence de décharge dans les axones [Soleng et al., 2003] [Aponte et al., 2006] [Bender et al., 2005] [Aponte et al., 2006] [Lujan et al., 2005], l'accommodation dans des récepteurs sensoriels (cônes et bâtonnets [Attwell and Wilson, 1980], papilles gustatives...). Nous rapportons ici plus précisément l'état des connaissances sur trois types de mécanismes impliquant le courant I_H : La génération de rythme, la définition d'un potentiel de repos et la participation à l'intégration dendritique dans le compartiment somato-dendritique.

2.4.1 Le courant I_H : un courant "pacemaker"

rythme cardiaque

La génération du rythme cardiaque a lieu dans un groupe de cellule capable de délivrer des potentiels d'action à intervalle régulier de manière spontanée dans le noeud sinusal. Le courant I_H dépolarise la cellule jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action. Ce dernier est causé par l'ouverture de canaux calciques de type T ($I_{Ca,T}$) puis de canaux calciques de types L ($I_{Ca,L}$). L'ouverture consécutive de canaux potassiques ramène le potentiel de membrane quasiment au potentiel d'inversion du potassium. Le courant I_H est alors à nouveau activé et commence un nouveau cycle. La fréquence du cycle est déterminée par la durée de redépolarisation de la cellule entre deux potentiels d'action. Or cette durée est définie par la cinétique d'ouverture des canaux HCN. Comme HCN2 est la principale protéine HCN exprimée dans ces cellules, le courant I_H y est fortement sensible à l'AMPc. C'est pourquoi l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire, par exemple après activation des récepteurs β -adrénergiques, accélère la cinétique d'activation du courant I_H et augmente la fréquence cardiaque. Réciproquement l'activation de récepteurs cholinergiques diminue la concentration en AMPc et donc la fréquence cardiaque [Difrancesco, 1993][Kaupp and Seifert, 2001] (voir la Fig.2.7-A).

Génération de rythme dans le système nerveux

Le courant I_H est impliqué dans la génération de rythme dans plusieurs systèmes neuronaux. Il joue un rôle dans les oscillations de trois manières [Robinson and Siegelbaum, 2003] : (a) en imposant directement un mode de décharge régulière spontanée, (b) en facilitant le couplage entre l'activité spontanée de la cellule et des entrées synaptiques rythmiques et (c) en étant à l'origine d'oscillations subliminaires

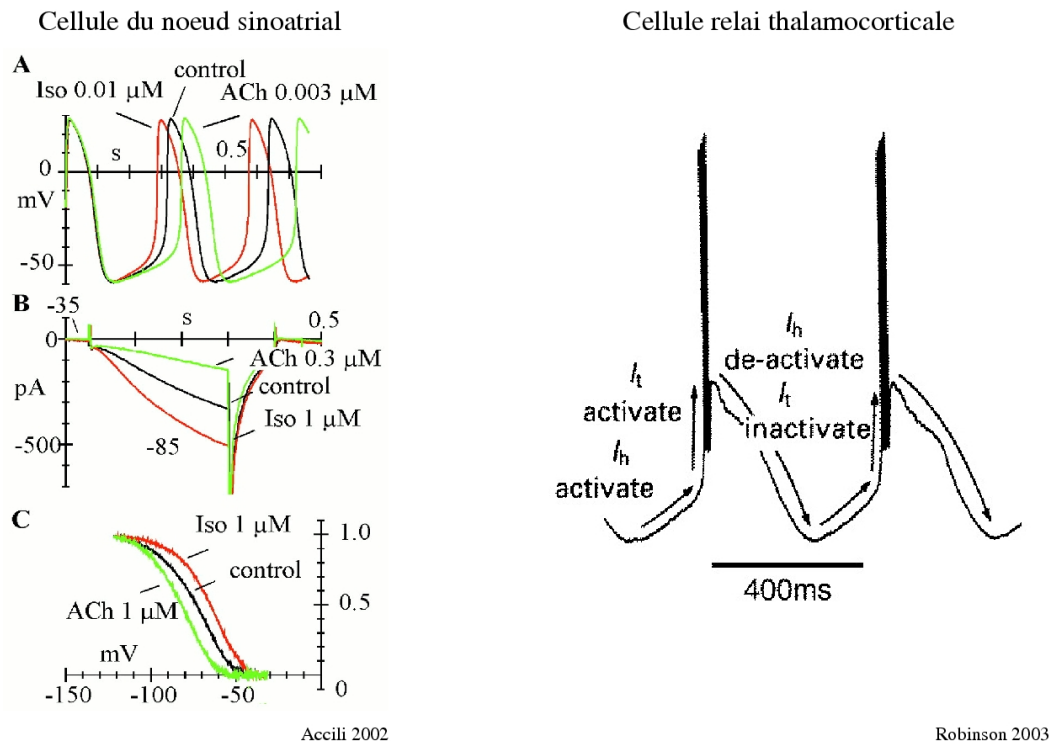


Fig. 2.7: I_H : courant pacemaker

Cycle de décharge spontanée dans une cellule du sinus atrial du coeur (gauche) :

A) La vitesse de redépolarisation entre deux potentiels d'action calciques est définie par le courant I_H . Lorsque la courbe d'activation de I_H est décalée vers des valeurs plus dépolarisées par l'activation des récepteurs β -adrénergiques (agoniste isoprenaline, en rouge) (C), un plus grand nombre de canaux HCN sont ouverts pour le même potentiel de membrane (B), la redépolarisation est plus rapide et donc la fréquence est plus haute (A). Lorsque la courbe d'activation est décalée vers des valeurs plus hyperpolarisées par l'activation des récepteurs cholinergiques (Acétylcholine, en vert), la fréquence est plus basse. (extrait de [Accili et al., 2002])

Décharges régulières en bouffées dans une cellule relais thalamocorticale isolée pharmacologiquement (droite) : la période de redépolarisation entre deux bouffées est définie par I_H ; I_{CaT} est responsable de l'initiation de la bouffée (extrait de [Robinson and Siegelbaum, 2003]).

comme dans les cellules étoilées du cortex entorhinal de la couche II/III. Il est donc capable soit de générer des oscillations dans des cellules seules, soit dans des réseaux de plusieurs neurones [Lüthi and McCormick, 1998a].

Les cellules du relais thalamocortical La génération spontanée de rythme a été particulièrement bien décrite pour le cas des cellules relais thalamocorticales. Associées aux ondes lentes du sommeil ou, en conditions pathologiques, à des crises d'absence, des oscillations synchronisées apparaissent spontanément dans le système thalamocortical. Ces oscillations ne s'arrêtent plus quand on bloque le courant I_H [Bal and McCormick, 1996]. Quand ces cellules sont isolées pharmacologiquement, elles déchargent par bouffées (*burst*) à une fréquence entre 0,5 et 4 Hz. L'activation de $I_{Ca,T}$ initie un potentiel d'action calcique qui provoque à son sommet une bouffée de potentiel d'action sodique rapide. L'inactivation de $I_{Ca,T}$ arrête les décharges. La repolarisation qui suit active le courant I_H qui définit la vitesse de repolarisation jusqu'au seuil d'activation de $I_{Ca,T}$ dont l'inactivation a été levé par l'hyperpolarisation. La régularité de l'oscillation intrinsèque dépend de cette phase de repolarisation conduite par I_H [McCormick and Bal, 1997]. L'accélération du courant I_H , par l'AMPc par exemple, accélère la fréquence [Lüthi and McCormick, 1998a][Pape, 1996].

Comme nous l'avons vu plus haut, une surexpression de HCN1 ou l'absence de HCN2 dans les cellules relais thalamocorticales sont responsables de crise d'absence dans différents modèles génétiques [Ludwig et al., 2003][Ludwig et al., 2003][Budde et al., 2005]. Dans les rat WAG/rij notamment on observe des trains d'onde à potentiel d'action (SWD pour *spike-wave discharges*). La surexpression de HCN1 chez ces animaux provoque un décalage de la courbe d'activation vers des valeurs plus négatives, et une diminution de la sensibilité à l'AMPc. On comprend alors le rôle du courant I_H en cas non pathologiques pour arrêter les oscillations. Les potentiels d'action calciques activent la production d'AMPc, qui décale vers des valeurs plus dépolarisées la courbe d'activation du courant I_H qui s'active plus tôt ce qui amortit les oscillations jusqu'à l'arrêt [Budde et al., 2005]. Un mécanisme similaire d'initiation de rythme impliquant le courant I_H , I_{CaT} , I_{CaL} et I_{AHP} existe dans les cellules de l'olive inférieure [Bal and McCormick, 1997].

I_H semble aussi être directement en cause dans la génération de rythme au niveau des interneurons O/A de CA1 [Maccaferri and McBain, 1996][Strata et al., 1997]. Dans notre étude nous confirmons cette constatation.

La génération de rythme au sein d'un réseau peut aussi impliquer le courant I_H . Cela a été particulièrement bien décrit dans le cas du réseau simple constitué par des interneurons ganglionnaires de sangsue qui contrôle la contraction rythmique des

tubes cardiaques. Ces interneurons sont interconnectés par des synapses inhibitrices. La décharge de potentiel d'action dans un premier interneurone inhibe et hyperpolarise le second. I_H est activé dans le second interneurone qui se dépolarise jusqu'au seuil de décharge. Cette décharge de PA dans le second interneurone inhibe et hyperpolarise le premier interneurone ; et ainsi de suite [Lüthi and McCormick, 1998a]. Dans le cerveau mammifère, plusieurs mécanismes semblables ont été décrit qui impliquent I_H . Notamment les ondes delta et les ondes en fuseau (*spindle waves*) observées dans le thalamus qui sont générées par l'interaction entre les neurones GABAergiques du noyau réticulaire et les neurones relais excitateurs [McCormick and Bal, 1997].

Un nombre croissant d'étude indique également un rôle de I_H dans la génération des oscillations θ . Comme nous le verrons plus en détail au cours de notre étude, I_H y est impliqué à la fois au niveau de cellule seule qu'au niveau du couplage entre décharge régulière et inhibition et/ou excitation.

Il faut toutefois remarquer que I_H n'est pas obligatoire pour générer un rythme dans une cellule excitable. Il n'est pas nécessaire dans les cellules de Purkinje du cervelet et dans les neurones respiratoires du tronc même si dans le premier cas son blocage conduit à un état bistable. Certaines publications remettent aussi en cause son importance dans la génération de rythme dans les cellules du noeud sinusal [Vassalle, 1995][Robinson and Siegelbaum, 2003]

2.4.2 I_H et le potentiel de repos

Dans les cellules où il est présent et quand sa courbe d'activation commence à des valeurs suffisamment dépolarisée ($V_{1/2}$ pas trop négatif, k pas trop raide), le courant I_H participe à la définition du potentiel de repos [Dickson et al., 2000]. En effet, lorsque le courant I_H est bloqué soit par ZD7288, soit par Cs^+ extracellulaire, une cellule mesurée en courant imposé présente un potentiel de membrane plus hyperpolarisé. Par exemple, parmi les interneurons du *stratum oriens* de CA1, certains ont un fort courant I_H (certains des interneurons à parvalbumine, voir plus haut), et d'autre non (interneurons CCK). Ces derniers ont un potentiel de membrane beaucoup plus hyperpolarisé, -73 mV contre -61 mV pour les autres [Lupica et al., 2001]. La dépolarisation du potentiel de membrane provoquée par I_H augmente l'excitabilité des cellules, non seulement en réponse à l'excitation [Lupica et al., 2001], mais aussi en réponse à l'inhibition car il facilite l'apparition de décharges en rebond suite à l'hyperpolarisation imposée par les PPSI [Brewster et al., 2002].

Dans certain cas, l'hyperpolarisation du potentiel de membrane et l'augmentation de la résistance de membrane consécutives à un blocage des courants I_H sont

les seuls indices électrophysiologiques de la présence de canaux HCN fonctionnels [Rateau and Ropert, 2006][Aponte et al., 2006].

2.4.3 I_H et intégration dendritique

Si un potentiel de repos plus dépolarisé rapproche du seuil de déclenchement d'un potentiel d'action, toute dépolarisation conduit à la fermeture des canaux HCN, et donc à un **courant sortant** virtuel. Ce qui aboutit à des comportements à première vue paradoxaux. La présence d'une conductance I_H amortit tout changement de potentiel de membrane infraliminaire : une hyperpolarisation comme un potentiel postsynaptique inhibiteur sera contrecarrée par une activation accrue du courant I_H et une dépolarisation comme un potentiel postsynaptique excitateur sera également contrecarrée par une désactivation du courant I_H "de repos". Ce rôle de I_H dans la dynamique de la résistance de membrane permet de complexifier l'intégration du signal synaptique dans l'arbre dendritique d'une cellule pyramidale. En effet, la présence de courant I_H atténue l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs, mais surtout accélère leur décours temporels (Voir Fig.2.8).

Nous avons déjà décrit la distribution particulière du courant I_H le long de l'axe somato-dendritique des cellules pyramidales de CA1 [Magee, 1998] et de la couche 5 [Berger et al., 2001], due au patron spatial d'expression de HCN1 [Lörincz et al., 2002] (Fig.2.6). Cette distribution particulière permet une normalisation du décours temporel des PPSE dans les cellules pyramidales de CA1 [Magee, 1999] et de la couche 5 [Williams and Stuart, 2000][Berger et al., 2001] et une normalisation du décours temporel des PPSI des pyramidales de la couche 5 [Williams and Stuart, 2003]. En effet, avec les seuls propriétés passives de membrane, plus les PPSE et les PPSI sont initiés loin du soma, plus leur forme est aplatie par la transmission le long des dendrites quand ils arrivent au soma. Or on observe au contraire qu'il y a indépendance entre le lieu d'initiation des PPSE et des PPSI et leur décours temporel dans le soma. Le courant I_H effectue cette normalisation en accélérant d'autant plus les PPS qu'ils sont éloignés du soma. Le blocage du courant I_H fait disparaître cette normalisation (voir Fig.2.9). L'intérêt informationnel de cette normalisation est particulièrement visible dans le cas de série de PPSE, qui se somment au point de ne plus être distinct quand on bloque le courant I_H (voir Fig.2.9-gauche-A) [Magee, 1999][Williams and Stuart, 2000]. Cette normalisation des PPSE dans les cellules pyramidales de CA1 est achevée par le fait que leur amplitude est d'autant plus grande qu'ils sont initiés loin du soma [Magee and Cook, 2000]. Néanmoins, elle n'agit que dans les cas où les dendrites sont suffisamment hyperpolarisées pour que le courant I_H soit activé, ce qui n'est pas toujours le cas [Williams and Stuart, 2003].

De plus l'activation du courant I_H par la lamotrigine, un anticonvulsant, appliquée localement au niveau des dendrites diminue l'excitabilité dans les dendrites sans beaucoup de changement dans le soma. La lamotrigine décale la courbe d'activation vers des valeurs plus dépolarisées, et donc diminue la résistance d'entrée dans les dendrites [Poolos et al., 2002].

Le courant I_H exprimé selon un gradient décroissant sur l'axe somato-dendritique dans les PLP participe aussi à la normalisation de la sommation temporelle des entrées synaptiques. Cette normalisation peut donc se produire avec différents patrons spatiaux d'expression de I_H [Bullis et al., 2006].

I_H participe à la complexité des capacités intégratives et computationnelles de l'arbre dendritique des cellules pyramidales. Pour comprendre plus finement ces capacités intégratives de l'arbre dendritique, il faut comprendre le jeu d'ensemble des différents courants ioniques intrinsèque. Cela a pu être exploré par un certain nombre de travaux de modélisation qui ont remis dans un contexte plus large l'importance du courant I_H , en interaction avec d'autres courants comme le courant potassique I_A , le courant sodique persistant $I_{Na,P}$ et différents courants calciques (type L, T...) [Poirazi et al., 2003][Migliore and Shepherd, 2002].

Détection de coïncidence dans le système auditif des oiseaux La perception de la différence temporelle interaurale essentielle pour l'évaluation de la localisation azimuthale d'une source de son a lieu dans le noyau laminaire (*nucleus laminaris* NL). L'expression de HCN1 varie depuis une très forte expression pour les neurones à fréquence caractéristique basse jusqu'à une expression faible pour les neurones à fréquence caractéristique haute. HCN2 par contre est également exprimé quelque soit la fréquence caractéristique des neurones. L'amplitude de courant I_H est plus grande dans les cellules à fréquence caractéristique basse. Les propriétés électrophysiologiques des courants I_H sont aussi cohérentes avec le niveau d'expression de HCN1 : courant plus rapide et activé à des potentiels plus dépolarisés dans les cellules à fréquence caractéristique basse que dans celles à fréquence caractéristique haute. Le potentiel de membrane des différentes catégories est également d'autant plus dépolarisé que HCN1 y est fortement exprimé. Une grande différence de forme des PPSE dans les trois catégories de cellules est observée : des PPSE d'autant plus court que la fréquence caractéristique est basse. Ces différences sont en partie dues aux courant I_H . L'application de noradrénaline (NA) augmente le courant I_H dans les cellules à fréquence caractéristique haute dont le rapport en HCN2 est plus fort. Le décours temporel des PPSE dans ces cellules est beaucoup plus accéléré que dans les autres types cellulaires, la précision de la détection de coïncidence temporelle également. Ce modèle illustre bien comment la mise en forme (*shaping*) des PPSE

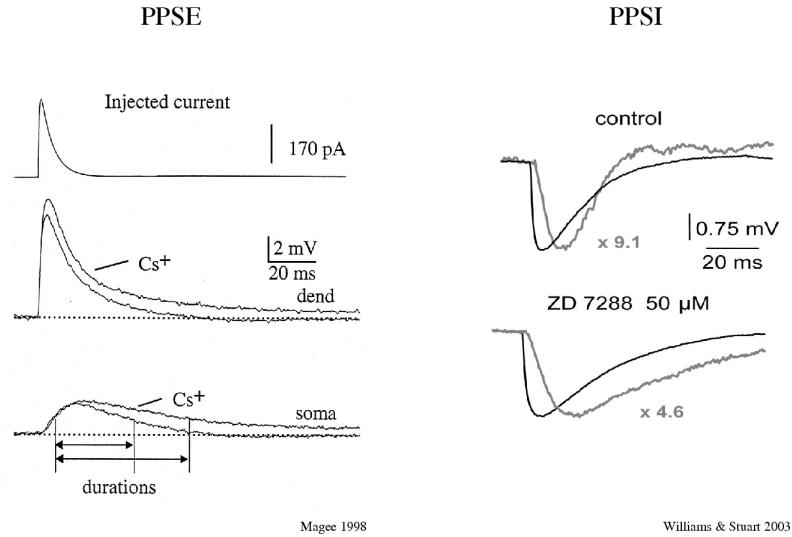
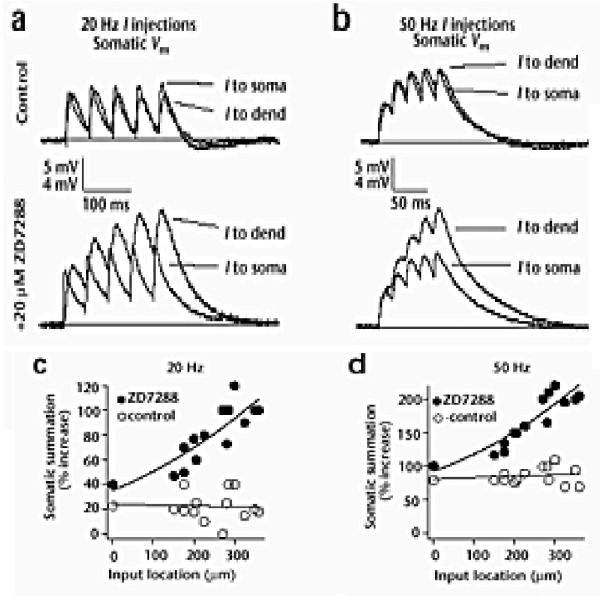


Fig. 2.8: Mise en forme des PPS par le courant I_H

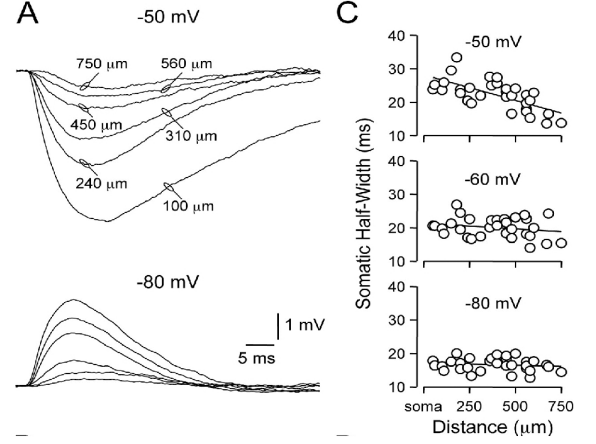
Mise en forme des PPSE par I_H : le blocage du courant I_H (par du Cs^+ extracellulaire) rallonge la durée d'un PPSE induit par l'injection d'un courant simulant un CPSE dans les dendrites (cellules pyramidales de CA1). Cet effet est surtout visible après la propagation du PPSE jusque dans le soma (en bas) [Magee, 1998].

Mise en forme des PPSI par I_H : le blocage du courant I_H (par du ZD7288) rallonge la durée d'un PPSI (dans les cellules pyramidales de la couche 5). En gris, le courant simulant un CPSI est injecté dans les dendrites (à $680 \mu m$), en noir, le courant est injecté dans le soma. La cinétique de montée de l'inhibition est à peine concernée par le blocage du courant I_H . La durée du PPSI augmente surtout à cause de la durée de repolarisation [Williams and Stuart, 2003].

Normalisation de la sommation de PPSE



Normalisation conditionnelle des PPSI



Magee 1999

Williams & Stuart 2003

Fig. 2.9: Normalisation de la sommation de PPS le long des dendrites par le courant I_H
Normalisation de la sommation de PPSE par I_H : A) et B) En haut : réponses à l'injection de courants postsynaptiques à 20 Hz (A) et à 50 Hz (B) soit dans le soma (I to soma; 308 pA) soit dans les dendrites (I to dendrite; 285 μm ; 832 pA). En bas : blocage du courant I_H par 20 μM de ZD7288.

C) et D) sommation de PPSE en fonction de la distance au soma, en conditions contrôles (cercle plein) et en présence de ZD7288 (cercle vide). En présence de ZD7288 la sommation augmente en s'éloignant du soma, au contraire des conditions contrôles.

[Magee, 1998].

Normalisation conditionnelle des PPSI : A) Mesure au niveau somatique de PPSI dendritique générés à différentes distance du soma (indiquée par une flèche) ; à potentiel de membrane dépolarisé (-50 mV, en haut) et hyperpolarisé (-80 mV, en bas). C) décours temporel des PPSI en fonction de la distance pour différents potentiel de membrane.

À potentiel de membrane hyperpolarisé (-80 mV), le décours temporel des PPSI est indépendant du lieu d'initiation dans les dendrites. À potentiel plus dépolarisé (-50 mV), le courant I_H n'agit plus sur la forme des PPSI et la normalisation n'a plus lieu [Williams and Stuart, 2003].

par I_H améliore la précision du codage temporel. Il montre aussi comment la modulation possible du courant I_H est une voie de régulation de la précision [Yamada et al., 2005]. Il se pourrait que des mécanismes analogues aient lieu chez les mammifères : le patron d'expression des protéines HCN dans les noyaux auditifs (anteroventral cochlear nucleus (AVCN), medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) lateral superior olive (LSO)) est très différencié ainsi que les propriétés électrophysiologiques des courants I_H dans les cellules de chacune de ces structures [Leao et al., 2006].

Chapitre 3

Organisation temporelle de l'activité de réseau et courants intrinsèques

Le temps devient temps humain dans la mesure où il est articulé sur un mode narratif, et (...) le récit atteint sa signification plénière quand il devient une condition de l'existence temporelle.

Paul Ricœur (*Temps et Récit*)

3.1 Organisation temporelle de l'activité de réseau dans le SNC

3.1.1 Enjeux de la compréhension du codage temporel

L'une des principales questions des neurosciences est d'établir le code neuronal. Si un certain nombre de systèmes fonctionnent avec un codage par fréquence, notamment dans les premières étapes du codage de l'information sensorielle, à des niveaux plus complexes de traitement de l'information, la **précision temporelle** (le *timing*) devient énergétiquement plus économe [VanRullen et al., 2005][Heil, 2004]. Dans les premiers niveaux d'intégration de l'information visuelle, il est par exemple établi qu'on a un codage par convergence de l'information. Mais pour les niveaux supérieurs, comme la reconnaissance de forme complexe, de visage, etc. ce type de codage semble encore trop rigide. Il a été proposé qu'à ces niveaux le codage s'effectue par **liaison** (*binding*), c'est à dire par l'activation simultanée d'un groupe de neurone pour une même combinatoire d'entrée informationnelle. Chaque neurone pouvant être engagé dans la reconnaissance de plusieurs combinaisons [Singer and Gray, 1995].

Dans les deux derniers cas, il faut des mécanismes qui assurent une bonne organisation temporelle du traitement de l'information à travers les réseaux neuronaux. Dans le premier cas, la détection de coïncidence est critique [Heil, 2004]. Dans le second, il faut être sûr que l'activation simultanée d'un groupe de neurone corresponde à une information. Il faut que cette activation simultanée ne soit pas ambiguë. Une augmentation simultanée du taux de décharge dans une population ne semble pas appropriée. Par contre la **synchronisation** d'une sous-population de neurone semble à même d'assurer un codage par liaison non ambiguë et précis [Singer and Gray, 1995].

3.1.2 Mécanismes computationnelles de l'organisation temporelle de l'activité de réseau

L'organisation temporelle du traitement de l'information par le système nerveux utilise essentiellement deux catégories de mécanisme computationnelle étroitement liées :

- la précision temporelle de la génération d'un potentiel d'action par rapport à un signal ou à une combinatoire de signaux
- la synchronisation des décharges de PA au sein d'une population de neurone.

Le codage par précision temporelle

Un codage utilisant la précision temporelle du potentiel d'action, de sa génération comme de sa propagation, a été identifié dans plusieurs systèmes neuronaux, comme dans les fibres nerveuses périphériques du système somatosensoriel humain, dans le cortex en tonneau de rat, dans le cortex auditif, dans la rétine, dans la région V1 du cortex visuel, dans les régions hippocampales CA1 et CA3 [VanRullen et al., 2005]... La précision temporelle de la première décharge porte par exemple suffisamment d'information pour la localisation de la source d'un son par des neurones du cortex auditif [Furukawa and Middlebrooks, 2002]. Dans le système auditif la précision temporelle du premier PA porte une information sur l'intensité, la fréquence et le contexte du son [Fricker and Miles, 2001]. La précision temporelle du premier PA est aussi utilisé dans le codage de la perception tactile [Johansson and Birznieks, 2004].

La diminution de l'excitabilité dans une région corticale suite à la privation des entrées sensorielles (comme l'oblitération d'un oeil) constitue une preuve indirecte de l'importance développementale de la précision temporelle. En effet cette diminution d'excitabilité ne correspond pas à une diminution de l'activité dans les voies sensorielles afférentes, mais à une perte de précision des potentiels d'action qu'elles apportent. Comme, à même niveau d'activité, la probabilité d'avoir deux signaux désappariés est plus forte, les mécanismes

de plasticité dépendante de la précision temporelle (STDP ; *Spike Timing Dependent Plasticity*) provoquent une dépression de toutes les synapses, et donc la diminution de l'excitabilité observée [Fox, 2000].

Synchronisations

La synchronisation de décharge d'un grand nombre de neurone est depuis longtemps observée par la mesure des potentiels de champ générés au niveau de l'encéphale (électroencéphalogrammes, EEG). En particulier, à travers des activités rythmiques qui génèrent des oscillations répertoriées selon leur spectre de fréquence et leur contexte comportemental. La capacité d'une population de neurone à se synchroniser est liée à la précision temporelle car l'émergence et la prolongation d'une activité rythmique synchrone est la conséquence de transmissions suffisamment précises pour ne pas la désorganiser.

Ces deux mécanismes computationnelles mettent en jeu un grand nombre de mécanismes physiologiques où interviennent à la fois l'architecture des connexion entre neurones, les propriétés de la transmission synaptique et les caractéristiques des courants ioniques intrinsèques responsables de l'excitabilité intrinsèque (que nous appelons "courants intrinsèques").

Nous présentons d'abord un rapide aperçu de ces mécanismes physiologiques de l'organisation temporelle du traitement de l'information par des réseaux neuronaux, en insistant sur le rôle des courants intrinsèques, sachant qu'il se comprend toujours/souvent en lien étroit avec l'architecture du réseau et les propriétés des transmissions synaptiques.

3.2 Rôle des canaux ioniques intrinsèques dans la précision et la synchronisation

3.2.1 Résonance intrinsèque

Plusieurs types de neurone possèdent une fréquence de résonance à laquelle l'amplitude de la réponse à un signal d'entrée sinusoïdale est maximale. Les neurones non résonants agissent comme des filtres passe-bas à cause des caractéristiques électriques passives de membrane (résistance et capacitance de membrane) (Figure. 3.1-(2)b et Figure. 3.2-(2)) [Hutcheon et al., 1996a][Hutcheon et al., 1996b][Hutcheon and Yarom, 2000]. Les neurones résonants agissent comme des filtres passe-bandes. Leur réponse est atténuée pour un signal à basse fréquence et pour un signal à haute fréquence, elle est maximale autour

de leur fréquence préférentielle ou **fréquence de résonance** (Figure. 3.1 ; Figure. 3.2-1).

Analyse fréquentielle Afin de caractériser la fréquence de résonance d'un neurone, Puil et ses collaborateurs ont mis au point une analyse fréquentielle des variations de potentiel de membrane en réponse à un signal injecté en courant imposé composé d'une série continue de sinusoïde à fréquence croissante (ou décroissante) ¹ [Puil et al., 1986]. On visualise en temps réel l'amplitude de la réponse, et donc l'existence ou non d'une fréquence préférentielle (Figure. 3.1-(1).A1). Le rapport des transformées de Fourier de la réponse et du signal d'entrée donne l'amplitude d'impédance en fonction de la fréquence. La fréquence de résonance correspond au maximum d'amplitude d'impédance (Figure. 3.1-1).

Neurones résonants Une fréquence de résonance a été décrite dans les cellules pyramidales de la couche 5 du néocortex [Hu et al., 2002], dans les cellules étoilées de la couche II du cortex entorhinal (mais pas dans les cellules pyramidales de la couche III) [Haas and White, 2002][Erchova et al., 2004], dans les cellules pyramidales de la région CA1 [Ulrich, 2002][Pike et al., 2000], du subiculum [Wang et al., 2006], dans les interneurons à décharge rapide du stratum pyramidale de CA1, dans les interneurons horizontaux du stratum oriens [Pike et al., 2000], dans les neurones thalamocorticaux [Reinker et al., 2004] et dans les neurones de l'olive inférieure [Lampl and Yarom, 1997] (Voir Tableau.3.1).

Les courants intrinsèques infraliminaires définissent la fréquence de résonance

La résonance des neurones néocorticaux est sensible au potentiel de maintien [Hutcheon et al., 1996b]. Dans les cellules pyramidales de la région CA1, la force de résonance est minimale proche du potentiel de repos (autour de -65 mV), elle augmente quand on dépolarise et quand on hyperpolarise le potentiel de maintien [Hu et al., 2002]. La fréquence de résonance est très sensible à la température [Hu et al., 2002] (Voir Tableau.3.1). Ces deux caractéristiques ont été les premiers indices du rôle de courants ioniques infraliminaires dans la définition de la résonance.

À des valeurs dépolarisées, le blocage du courant sodique persistant ($I_{Na,P}$) diminue l'amplitude de résonance (Figure. 3.3-(3)) [Hutcheon et al., 1996b] tandis que le blocage du courant potassique activé lentement par la dépolarisation sans inactivation (I_M) la fait

¹signal parfois surnommé "chirp", c'est à dire gazouillis

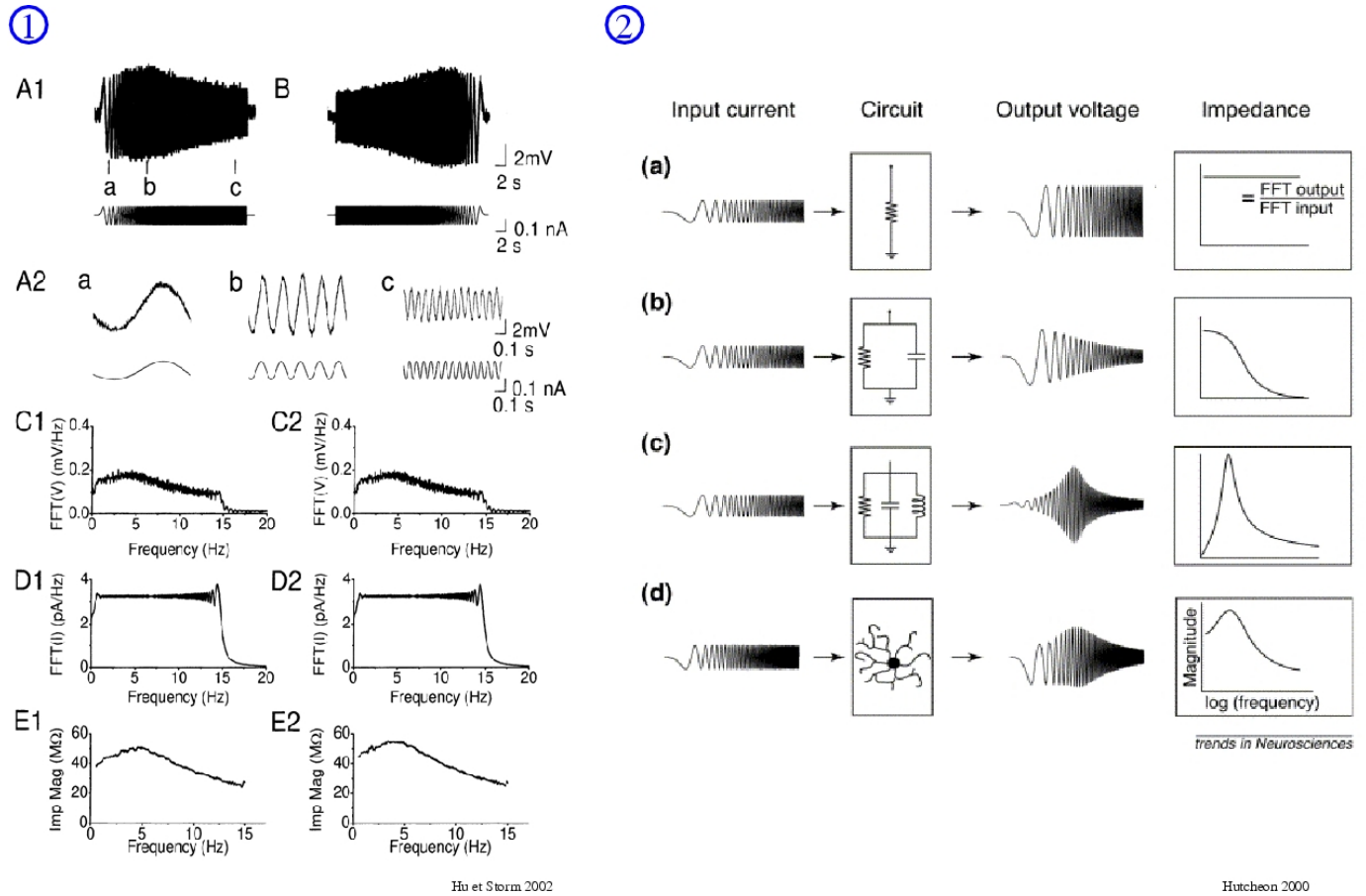


Fig. 3.1: Caractérisation des propriétés de résonance des neurones

(1) A) Réponse en courant imposé à un signal de fréquence sinusoïdale décroissante (à gauche) et croissante (à droite) de 0 à 15 Hz. La réponse est maximale pour la fréquence de résonance. B) Transformée de Fourier du potentiel en réponse. C) Transformée de Fourier du signal d'entrée. E) Magnitude d'impédance en fonction de la fréquence : rapport de la transformée de Fourier de la réponse du potentiel de membrane sur le signal d'entrée en courant imposé. Le maximum de la courbe correspond à la fréquence de résonance. (Extrait de [Hu et al., 2002])

(2) Circuit équivalent des différents types de réponse à un signal d'entrée en spectre de fréquence (chirp) : (a) résistance seule : aucun filtrage ; (b) circuit RC : filtre passe-bas, équivalent à une cellule sans courants ioniques actif à des potentiels infraliminaires ; (c) et (d) circuit RLC et neurone résonant : filtre passe-bande avec une fréquence préférentielle ou fréquence de résonance. (Extrait de [Hutcheon and Yarom, 2000])

disparaître (Figure. 3.3-(4)) [Hu et al., 2002]. À des valeurs hyperpolarisées, le blocage des courants rectifiants entrants potassiques (I_{KIR}) diminue la résonance (Figure. 3.3-(1)) [Hutcheon et al., 1996b] et le blocage du courant I_H la fait disparaître dans les cellules pyramidales de la couche 5 [Ulrich, 2002] et dans celles de CA1 [Hu et al., 2002] (Figure. 3.3-(1)(2)).

Hu et Storm parlent d'une **résonance H** pour la résonance liée au courant I_H aux potentiels hyperpolarisés et d'une **résonance M** pour la résonance liée au courant I_M aux potentiels dépolarisés. Effectivement, ces deux courants aux propriétés d'activation et de désactivation symétriques agissent de manière analogue dans des domaines de potentiel complémentaires. Le courant I_H est activé lentement par l'hyperpolarisation et génère un courant entrant qui s'y oppose. Le courant I_M est activé lentement par la dépolarisation et génère un courant sortant qui s'y oppose. À des potentiels hyperpolarisés, le courant I_H , en partie actif de manière tonique, est désactivé par une dépolarisation, et s'y oppose également en entraînant un courant résultant virtuellement sortant. À des potentiels dépolarisés, le courant I_M , en partie actif de manière tonique, est désactivé par une hyperpolarisation, et s'y oppose en entraînant un courant résultant virtuellement entrant. Comme ces deux courants ont des cinétiques d'activation et de désactivation lente, ils amortissent toute oscillation en opposition de phase avec leur cinétique propre. Ils sont indifférents pour des oscillations rapides car ils n'ont le temps ni d'être activés, ni d'être désactivés. C'est alors les propriétés passives de membrane qui amortissent les oscillations. La fréquence de résonance qu'ils définissent correspond à la fréquence pour laquelle le courant entrant généré par une phase hyperpolarisante de l'oscillation va être en phase avec la phase dépolarisante, et vice versa. Le courant entrant $I_{Na,P}$, actif de manière tonique à des potentiels dépolarisés et à cinétique rapide, va favoriser la résonance M et les courants sortants I_{KIR} , actifs de manière tonique à des potentiels hyperpolarisés et à cinétique rapide, vont favoriser la résonance H [Hu et al., 2002].

Il semblerait que l'interaction entre ces quatre courants ioniques, I_H , I_M , $I_{Na,P}$ et I_{KIR} , détermine une résonance sensible au potentiel de membrane dans plusieurs types de neurones. En effet, si aucune étude jusqu'à présent n'a établie simultanément dans le même type neuronal le rôle de ces quatre courants dans la résonance, ils y sont décrits dans de nombreuses études (Voir Tableau.3.1).

Le courant I_H est ainsi le principal courant responsable de la résonance dans les cellules pyramidales du subiculum. Les courants I_{KIR} atténuent la résonance et module la fréquence de résonance pour des potentiels de membrane hyperpolarisés. Le courant $I_{Na,P}$ amplifie la résonance pour des potentiels de membrane dépolarisés [Wang et al., 2006].

Le blocage du courant $I_{Na,P}$ par TTX réduit très fortement la résonance dans les inter-

neurones de CA1. Il n'a pas encore été déterminé si d'autres courants intrinsèques comme I_H ou I_M y sont impliqués [Pike et al., 2000].

D'autres courants ioniques peuvent être cependant impliqués dans les résonances neuronales. Dans les neurones de l'olive inférieure, la fréquence de résonance ne dépend ni des courants bloqués par le Ca^{2+} (I_H et I_{KIR}) ni de $I_{Na,P}$, mais seulement des courants calciques bloqués par Ni^{2+} [Lampl and Yarom, 1997]. Dans les neurones thalamocorticaux, l'ajout de bruit à un signal sinusoïdal continu augmente le rapport signal sur bruit (SNR pour *signal/noise ratio*). Ce phénomène est décrit comme une **résonance stochastique**. C'est à dire que le fait qu'il y ait une variabilité stochastique du courant transmembranaire améliore la qualité de la réponse de sortie à un signal de sortie pour une fréquence donnée. Or le SNR est optimal pour la fréquence de résonance de ces cellules. Ces résultats indiqueraient donc que l'ouverture stochastique de courants ioniques amplifierait encore l'effet des propriétés de résonance [Reinker et al., 2004].

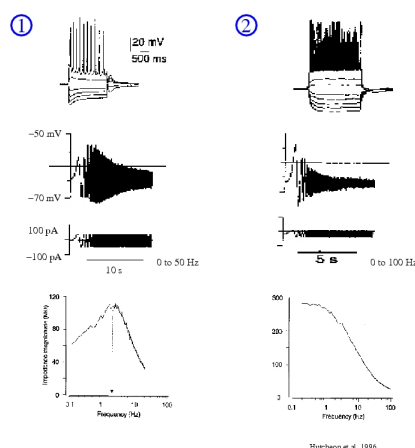


Fig. 3.2: Définition des propriétés de résonance par les courants intrinsèques
 (1) Exemple de neurones néocorticaux résonnant et (2) non résonant. En haut : caractérisation de la réponse des neurones à des créniaux de courant imposé. Au milieu : Réponse à un courant sinusoïdal de fréquence croissante. En bas : Magnitude d'impédance en fonction de la fréquence. Extrait de [Hutcheon et al., 1996b]

Conséquences fonctionnelles des propriétés de résonance

Des oscillations infraliminaires de potentiel de membrane ont été observées spontanément dans plusieurs types cellulaires (cellules étoilées de la couche II du cortex entorhinal [Erchova et al., 2004], cellules pyramidales de CA1 [Cobb et al., 1995] Figure.3.7-D,d...). Chacun de ces types cellulaires présentent une fréquence de résonance qui correspond à la fréquence spontanée d'oscillation. Néanmoins la présence d'une

Type cellulaire	Résonance H				Résonance M		Sources
	F_{res} (Hz)	I_H	I_{KIR}	I_M	$I_{Na,P}$	autres courants	
neurones corticaux	0,7-2,5 (25°C)	Gh	Ah	?	Ad		[Hutcheon et al., 1996b]
c. pyr. c.V	6 (35°C)	Gh	?	?	?		[Ulrich, 2002]
c. pyr. CA1	7 (38°C) ; 2-5 (33°C)	Gh	?	Gd	Ad		[Hu et al., 2002]
IN CA1 (FS & hSO)	1-5 & 10-50 (20-25°C)	?	?	?	G		[Pike et al., 2000]
c. pyr. subiculum	4-6 (32-35°C)	Gh	Ah	?	Ad		[Wang et al., 2006]
Olive inférieure	3-10 (33-34°C)	NE	?	NE	NE	I_{CaT}	[Lampl and Yarom, 1997]
c. étoilées c.II (cortex entorhinal)	5-15 (35°C)	?	?	?	?	?	[Erchova et al., 2004]
neurones thalamocorticaux	2 (23-25°C)	?	?	?		I_{CaT} , sto	[Reinker et al., 2004]

Tab. 3.1: I_H , I_M , $I_{Na,P}$, I_{KIR} et résonance dans différents types de neurones
 Neurones résonants et courants intrinsèques identifiés pour leur implication dans la résonance ;
 F_{res} : fréquence de résonance ; IN FS : interneurone à décharge rapide du stratum pyramidale ; IN hSO : interneurone horizontaux du stratum oriens ;
 G : génère la résonance ; A : amplifie la résonance ; h : à des valeurs hyperpolarisées ; d : à des valeurs dépolarisées ; NE : pas d'effet ; ? : non testé.

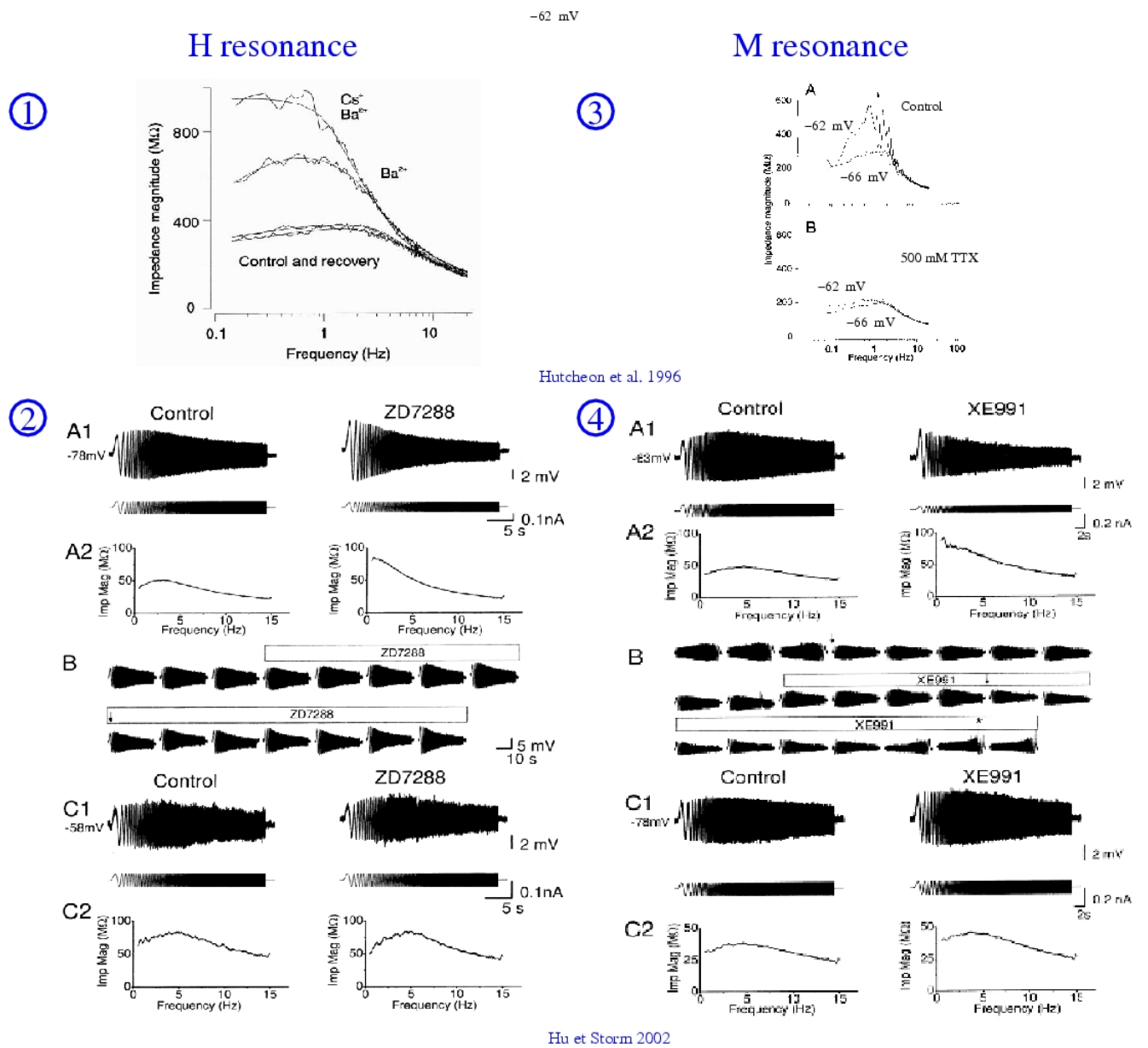


Fig. 3.3: Résonance H et résonance M dans les cellules pyramidales

- (1) À potentiel hyperpolarisé (-80 mV) : Diminution de résonance après blocage des courant I_{IR} (Ba^{2+}) et perte de résonance après blocage de I_H et I_{IR} ($Ba^{2+}+Cs^+$)
- (2) Le blocage du courant I_H fait disparaître la résonance à des potentiels hyperpolarisés, mais pas à des potentiels dépolarisés.
- (3) À potentiel dépolarisé : Forte contribution de $I_{Na,P}$ à la résonance. Comparaison du profil de résonance à -66 mV et -62 mV sans (en haut) et avec TTX (en bas).
- (4) Le blocage de I_M fait disparaître la résonance à des potentiels dépolarisés, mais par à des potentiels hyperpolarisés.

Extrait de [Hu et al., 2002] et [Hutcheon et al., 1996b]

fréquence de résonance n'entraîne pas forcément une oscillation spontanée de membrane [Erchova et al., 2004][Leung and Yu, 1998].

Parmi les neurones hippocampaux de la région CA1, la fréquence de résonance est souvent légèrement supérieure à la fréquence de décharge spontanée [Leung and Yu, 1998]. C'est notamment le cas des interneurons à décharge rapide (*Fast Spiking*) du stratum pyramidale et des interneurons horizontaux du stratum oriens [Pike et al., 2000].

La fréquence de résonance correspond aussi à une fréquence d'excitation synaptique à laquelle la probabilité de générer un PA est maximale [Wang et al., 2006].

Dans les cellules pyramidales de la couche 5 du néocortex, la résonance est d'autant plus forte que l'on s'éloigne du soma dans les dendrites, sans que la valeur de la fréquence de résonance change [Ulrich, 2002]. Il s'agit certainement de l'effet de la densité croissante de I_H le long de l'axe somato-dendritique (voir Figure. 2.6). Les propriétés de résonance de membrane peuvent donc avoir un rôle différencié dans les différents sous-compartiments cellulaires [Goldberg et al., 2006].

3.2.2 Précision temporelle de la décharge d'un potentiel d'action en réponse à un PPS

La transmission synaptique et l'intégration dendritique sont des moments clefs du traitement de l'information dans les réseaux neuronaux. La transmission synaptique correspond à une phase de conversion du signal. On a l'habitude de considérer que cette phase introduit un délai dans le flux du signal. Mais il s'agit aussi d'un moment critique pour maintenir ou non la précision temporelle de l'information.

L'intégration dendritique est l'opération qui permet de combiner plusieurs signaux. La simultanéité ou l'enchaînement à plus ou moins long terme de différentes informations dans l'arbre dendritique d'un même neurone sont autant d'informations nouvelles à traiter. Là encore la précision de chaque entrée en rapport au signal de sortie qui va être généré est critique.

Les mécanismes présynaptiques comme la propagation axonale [Debanne, 2004] et la précision de la libération de neurotransmetteur au niveau de la terminaison synaptique [Boudkkazi et al., 2007] déterminent le moment d'initiation d'un PPS. Les caractéristiques des récepteurs postsynaptiques définissent la cinétique, l'amplitude et le sens du courant postsynaptique. La propagation du potentiel postsynaptique ainsi généré dépend des propriétés de membrane passives et actives des compartiments subcellulaire le long desquels le potentiel est amené à se propager pour participer à la génération d'un signal de sortie.

La précision temporelle du couplage EPSP-Spike (E-S) peut se définir par la distribution des latences des PA en réponse à une stimulation répétée d'une voie synaptique telle que 50% des stimulations soient suivies d'une décharge. Dans certains cas où un PPSI induit la génération d'un PA en rebond, on peut aussi parler de couplage I-S. Nous montrons ici comment la forme d'un PPS détermine la précision temporelle de la décharge qu'il peut provoquer, et quels sont les mécanismes de mise en forme des PPS.

Importance de la forme des PPS pour déterminer la précision de décharge

Les PPS ont différentes cinétiques selon les synapses ou selon le stade du développement. La précision temporelle de la décharge consécutive à un PPSE est bien corrélée avec sa forme. Le long de la voie visuelle, on observe des connexions rétine-thalamus très précises (inférieure à la milliseconde) tandis que les connexions thalamus-cortex et cortex-cortex le sont beaucoup moins. Une étude théorique indique que le principal facteur responsable de la précision temporelle est le décalage temporel des PPSE postsynaptiques [Veredas et al., 2005]. La cinétique des CPSE au niveau des synapses entre fibres moussues et cellules en grain du cervelet s'accélère au cours du développement [Cathala et al., 2003] par une densification des récepteurs AMPA [Cathala et al., 2005][Bergles, 2005]. De manière synergique, la résistance de membrane diminue dans les cellules en grain matures, accélérant le décalage temporel des PPSE. Tous ces changements développementaux concourent à améliorer la précision du couplage E-S [Cathala et al., 2003].

Fetz montre que dans les motoneurones de chat, la fonction de probabilité de décharge en réponse aux PPSE (corrélation croisée entre le train de décharge en entrée et le train de décharge en sortie) correspond à la fonction dérivée du décalage temporel de cette population de PPSE. Cette règle n'est plus vérifiée avec des PPSE complexes. De même, l'efficacité d'inhibition d'un PPSI est proportionnelle à la vitesse d'hyperpolarisation [Fetz and Gustafsson, 1983].

Le couplage E-S dans les cellules pyramidales est beaucoup moins précis que dans les interneurones. Or, en comparant les PA déclenchés en réponse à des PPSE évoqués par stimulation électrique sur les fibres moussues dans les cellules pyramidales et les interneurones de CA1, on observe deux modes de déclenchement : soit pendant la phase montante du PPSE, soit pendant une phase de dépolarisation plateau succédant au PPSE. Le premier mode, très précis, a lieu tout le temps chez les interneurones. Les cellules pyramidales déchargent soit selon le premier mode, soit selon le second, beaucoup moins précis. (Fig. 3.4) [Fricker and Miles, 2000].

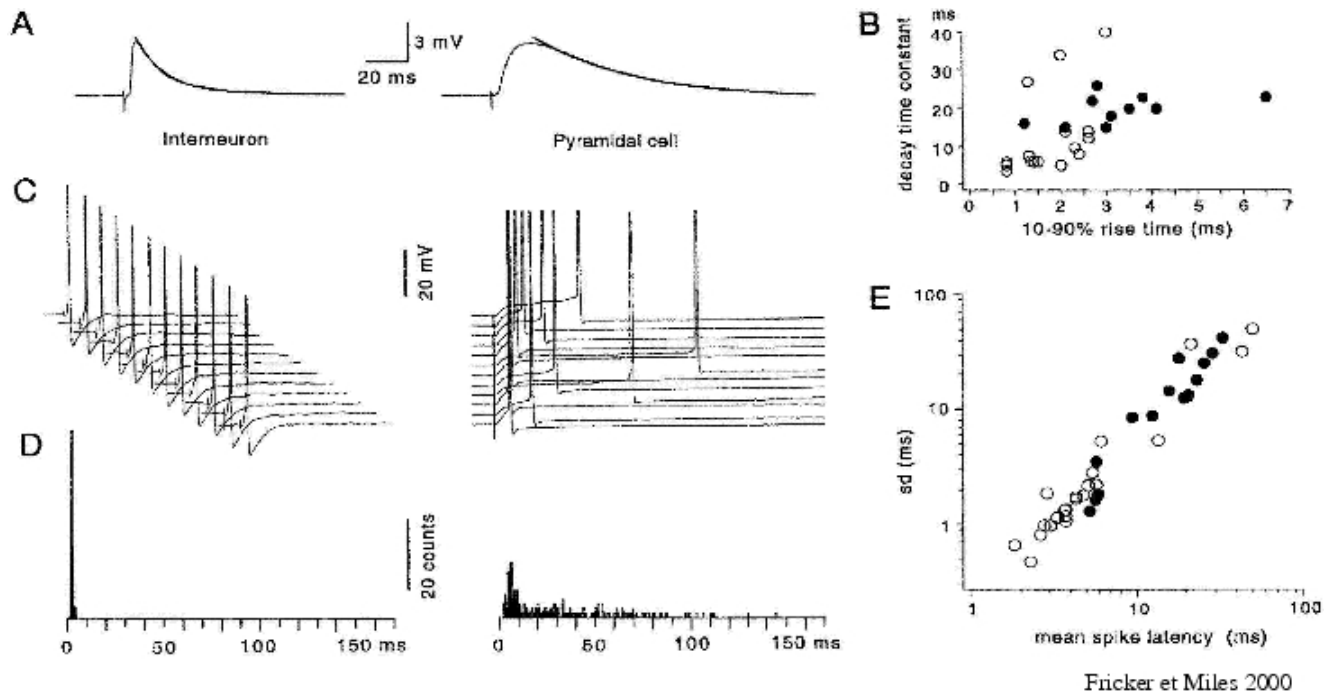


Fig. 3.4: Couplage E-S différencié dans les interneurons et les cellules pyramidales de CA1

A) PPSE induit par stimulation des voies collatérales de Schaffer dans les interneurons (à gauche) et dans les cellules pyramidales (à droite) ; B) Décours temporel des PPSE en fonction de leur durée de montée (ronds vides : interneurons, point plein : cellules pyramidales) ; C) Couplage entre PPSE et PA ; D) Histogrammes des latences entre stimulation et déclenchement de PA ; E) Moyenne des latences en fonction des écarts types. (Extrait de [Fricker and Miles, 2000])

Un potentiel d'action peut donc être généré pendant deux phases distinctes d'un PPSE, avec différentes règles de précision pour chacune :

1. Pendant la phase ascendante du PPSE : la corrélation entre la dérivée de la pente et la probabilité de décharge observée par Fetz dans les motoneurones s'applique ; plus la pente de dépolarisation est rapide, plus la précision de décharge est bonne.
2. Pendant la phase descendante du PPSE : plus la repolarisation est rapide, moins longtemps le potentiel de membrane reste proche du seuil de décharge et plus précise est la décharge si elle a lieu.

Des règles symétriques peuvent s'appliquer aux PPSI. L'inhibition de la décharge a lieu pendant la phase descendante. Le décours de redépolarisation établit une pente de dépolarisation dont la vitesse améliore la précision de décharge.

Pente de dépolarisation et précision de décharge

Il a été montré dans plusieurs cas que la vitesse de dépolarisation détermine la précision temporelle du déclenchement d'un PA.

La réduction du courant I_{AHP} , un courant potassique lent dépendant du calcium aussi appelé courant SK, par l'activation de mGluR5 dans les cellules pyramidales de la couche 5 augmente la précision temporelle de décharge en réponse soit à un créneau de courant dépolarisant, soit à un PPSE. La pente de dépolarisation précédant la génération d'un potentiel d'action est plus rapide après inhibition de I_{AHP} . L'injection en courant imposé de rampe de courant montre bien que plus la dépolarisation est rapide, plus la décharge est précise [Sourdet et al., 2003] (Figure.3.5).

Pente de dépolarisation pendant une AHP L'importance de la pente de dépolarisation pour la précision de la décharge consécutive est particulièrement bien illustrée par l'hyperpolarisation succédant à une décharge (posthyperpolarisation ou AHP pour *after-hyperpolarization*). Trois AHP ont lieu à différentes échelles de temps dans les cellules pyramidales de CA1. L'AHP rapide (fAHP, de 1 à 5 ms) est la prolongation de la repolarisation du PA. L'AHP intermédiaire (mAHP, de 50 à 200 ms) et l'AHP lente (sAHP, de l'ordre de la seconde) interviennent dans des phénomènes d'adaptation de fréquence de décharge précoce et tardif réciproquement. La mAHP est générée, à l'instar de la résonance, par le courant I_M à des valeurs de potentiel dépolarisées, et par le courant I_H à des valeurs de potentiel hyperpolarisées. Elle permet aux cellules pyramidales de décharger régulièrement à des fréquence θ [Gu et al., 2005].

Comme le montre l'analyse des mécanismes de génération spontanée et autonome d'oscillations observées dans des cellules cardiaques et dans plusieurs types de neurone, la

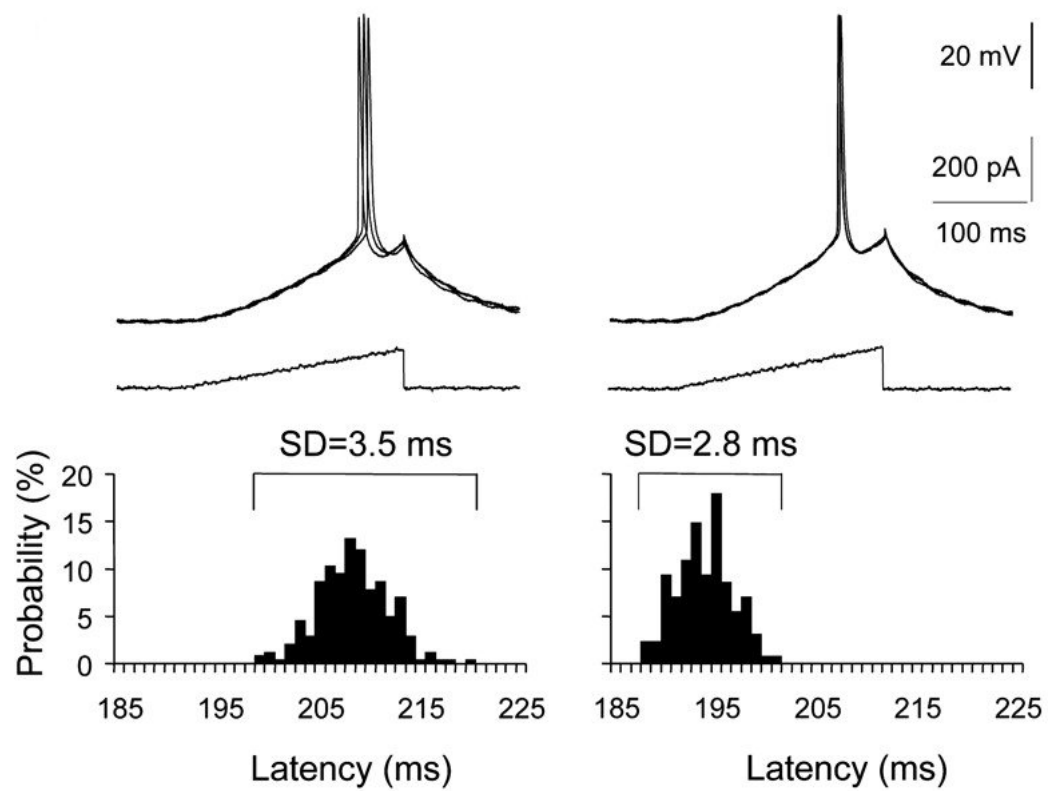


Fig. 3.5: La vitesse de dépolarisation détermine la précision de décharge
(Extrait de [Sourdet et al., 2003])

pente de dépolarisation consécutive à un potentiel d'action définit la précision temporelle à laquelle le PA suivant est généré. Nous avons vu que l'activation du courant I_H pendant l'AHP définit la vitesse de dépolarisation dans plusieurs de ces cellules (voir 2.4.1). Le courant I_{AHP} participe aussi à la régularité de décharge de cellules à décharge tonique comme les neurones dopaminergiques du tronc cérébral ventral ou des cellules à décharge rapide comme les cellules de Purkinje du cervelet [Bond et al., 2005].

Amplification de la dépolarisation d'un PPSE par des courants intrinsèques

Le même courant synaptique simulé injecté en courant imposé est amplifié dans les dendrites proximales par rapport au soma grâce à des courants sodiques de telle sorte qu'il a une plus forte probabilité de générer un PA [Oviedo and Reyes, 2002]. Cette amplification est atténuée par le courant I_H quand on s'éloigne du soma le long des dendrites, puis augmentée dans les dendrites apicales par le courant I_{CaT} [Oviedo and Reyes, 2005]. Les PPSE générés dans les dendrites apicales sont amplifiés par des courant calciques de type T [Gillessen and Alzheimer, 1997].

Pente de dépolarisation consécutive à un PPSI Le courant I_H accélère la repolarisation des PPSI dans les cellules pyramidales de la couche 5 (2.4.3). Dans les cellules pyramidales, on observe deux types de PPSI, des PPSI rapides initiés dans le soma et des PPSI lent initiés dans les dendrites. I_H accélère le décours temporel des PPSI et diminue leur amplitude tandis que $I_{Na,P}$ prolonge les PPSI et les amplifie. $I_{Na,P}$ est activé de manière tonique, l'hyperpolarisation causée par un PPSI désactive ce courant entrant ce qui augmente l'amplitude de l'hyperpolarisation. Cela est rendu possible par les cinétiques rapides d'activation et de désactivation de $I_{Na,P}$. Les PPSI rapides sont surtout concernés par les changements de durée (accélération par I_H et prolongation par $I_{Na,P}$) tandis que les PPSI lents sont plutôt sensibles aux changements d'amplitude. (Figure. 3.6) [Hardie and Pearce, 2006].

Cobb a montré dans une expérience élégante que l'initiation dans une cellule pyramidale de CA1 d'un PPSI à un potentiel de membrane proche du seuil de déclenchement des PA induit avec une bonne précision un PA en réponse au rebond consécutif (Figure.3.7-A). Quand on fixe le potentiel de membrane tel que le neurone décharge régulièrement, l'initiation d'un PPSI synchronise les PA suivants (Figure.3.7-C). Dans certains cas, un PPSI unitaire évoqué peut induire une oscillation infraliminaire du potentiel de membrane à des fréquences θ [Cobb et al., 1995]. Ce dernier résultat laisse penser qu'il s'agit de mécanismes semblables à ceux responsables de la résonance de membrane. Donc de mécanismes qui impliquent des courants intrinsèques tels que I_H et/ou I_M . Ce point reste à établir.

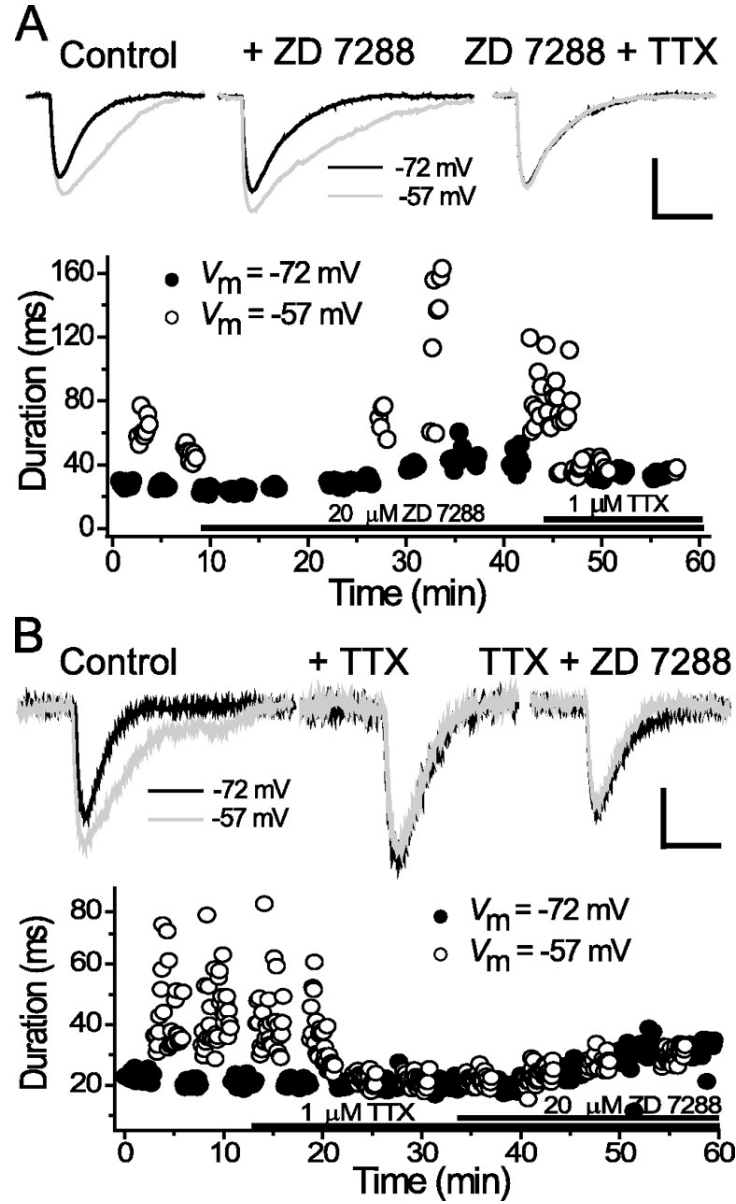


Fig. 3.6: Mise en forme des PPSI rapide et lent dans les cellules pyramidales par I_H et $I_{Na,P}$
 PPSI rapide artificiel injecté pendant une mesure en courant courant imposé à potentiel dépolarisé (-57 mV) ou hyperpolarisé (-72 mV); A) Le blocage du courant I_H (ZD7288 20 μ m) rallonge le décours temporel des PPSI générés à un potentiel hyperpolarisé. Le blocage de $I_{Na,P}$ (TTX 1 μ m) rend les PPSI indépendants du potentiel de membrane. B) Blocage de $I_{Na,P}$ avant celui de I_H : TTX rend les PPSI indépendant du potentiel de membrane, le ZD7288 rallonge le décours temporel des PPSI. Barres d'échelle : verticale, 2 mV ; horizontal, 50 ms. (Extrait de [Hardie and Pearce, 2006])

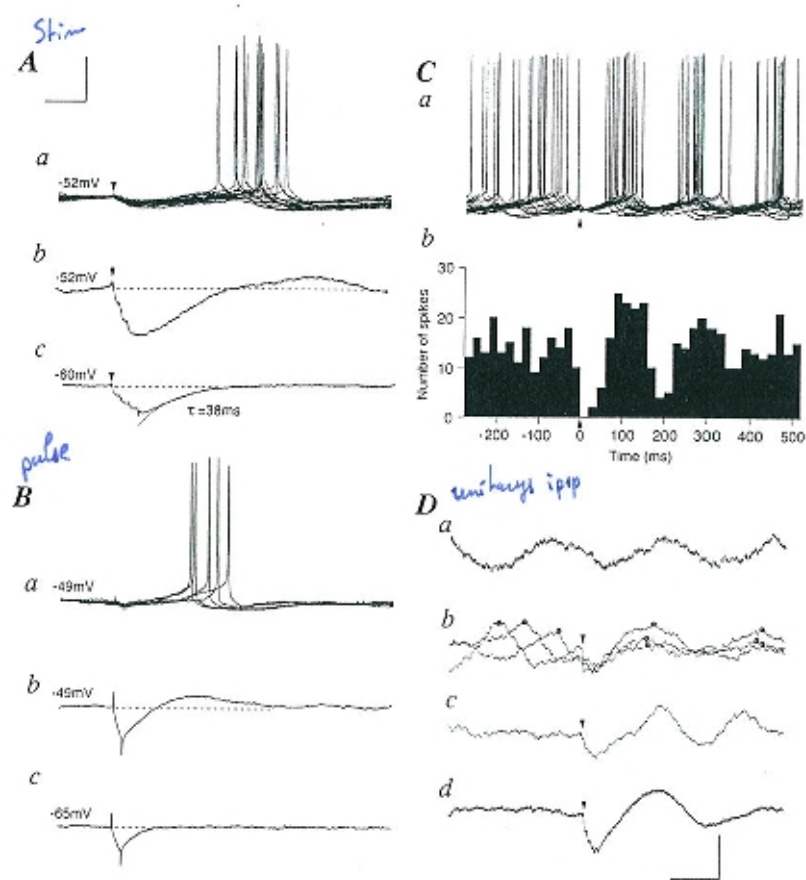


Fig. 3.7: Effet synchronisateur des PPSI dans les cellules pyramidales de CA1

A) réponse à un train court de 3 à 4 PA dans la cellule-panier présynaptique dans une cellule pyramidale ; a) 12 traces superposées, b) moyenne de 23 traces, c) réponse à potentiel plus hyperpolarisé.

B) réponse à un créneau hyperpolarisant bref.

C) Effet d'un PPSI unitaire sur le patron de décharge d'un pyramidal de CA1 ; a) 19 traces consécutives, b) histogramme des PA pour 132 enregistrements, 572 PA.

D) Effet d'un PPSI unitaire sur les oscillations de membrane infraliminaires ; a) Oscillations infraliminaires, b) 3 enregistrements superposés, c) un enregistrement où un PPSI unitaire initier une oscillation infraliminaire ; d) moyenne de 15 traces sans initiation de décharge. (barre d'échelle en D : vertical a-c, 4 mV et d, 2 mV ; horizontal, 100 ms)

Extrait de [Cobb et al., 1995]

Comment la vitesse de dépolarisation définit la précision temporelle de décharge ? S'il est établi dans de nombreux systèmes que la vitesse de dépolarisation du potentiel de membrane détermine la précision temporelle du déclenchement de PA, les mécanismes qui relient vitesse de dépolarisation et précision de décharge restent en débat.

Plus le potentiel de membrane s'approche du seuil de déclenchement, plus on observe une fluctuation du potentiel de membrane, due à une activité stochastique croissante des canaux sodiques [Savtchenko et al., 2001]. La précision temporelle du déclenchement d'un PA peut donc être définie par la durée pendant laquelle le potentiel de membrane est animée par de fortes fluctuations stochastiques. Plus la dépolarisation est rapide, moins longtemps le potentiel de membrane restera dans le domaine de potentiels auxquels les comportements stochastiques introduisent une forte variabilité du déclenchement de PA. La variabilité du déclenchement de PA peut aussi être due à une variabilité du seuil de déclenchement. Des mesures *in vivo* dans le cortex visuel appuyées par des simulations concluent à une variation dynamique du seuil de décharge. Il est d'autant plus bas que la vitesse de dépolarisation est rapide [Azouz and Gray, 2000]

L'accélération du déroulement temporel des PPSE améliore la précision de décharge

La deuxième phase d'un PPSE critique pour définir la précision temporelle concerne la repolarisation. En effet, plus un PPSE se prolonge, plus la latence de décharge est variable. *A contrario*, raccourcir le déroulement d'un PPSE diminue la variabilité de la latence (Fig. 3.4) [Fricker and Miles, 2000]. Plusieurs mécanismes interagissent pour contrôler finement la forme des PPSE. Ils mettent en jeu l'activité synaptique, le couplage électrique entre neurones et/ou l'activation/désactivation de courants intrinsèques.

Mise en forme des PPSE par l'activation de courants intrinsèques Dans la région CA1 de l'hippocampe, les cinétiques des PPSE évoqués *in vitro* par stimulation électrique et isolés de l'inhibition par blocage des récepteurs GABAergiques sont plus rapides dans les interneurons du *stratum radiatum* que dans les cellules pyramidales (Fig. 3.8-(1)). Le déroulement temporel des PPSE dans les cellules pyramidales est très sensible au potentiel de membrane : rapide à des valeurs hyperpolarisées, de plus en plus lent à des valeurs plus dépolarisées. Le blocage des courants sodiques par phénytoïne accélère le déroulement temporel des PPSE à des potentiels de membrane dépolarisés. Le blocage de récepteurs NMDA rend la cinétique des PPSE moins sensible aux changements de potentiel. Le courant entrant porté par les canaux sodiques prolonge donc le déroulement tem-

porel des PPSE dans les cellules pyramidales (Fig.3.8-(2)). Or le interneurones possèdent également ces canaux sodiques, à des densités même supérieures. Le décours temporel plus rapide des PPSE dans les interneurones est en fait dû à l'activation de courants potassiques (Fig. 3.8-(3)). La mesure des courants pendant l'injection en potentiel imposé de la forme d'un PPSE montre que cellules pyramidales et interneurones répondent par une succession de courants entrant puis sortant. Seulement l'amplitude du courant sortant est plus grande dans les interneurones que dans les cellules pyramidales (Fig. 3.8-(4)). La cinétique des PPSE influent directement sur la précision du potentiel d'action qu'ils induisent [Fricker and Miles, 2000].

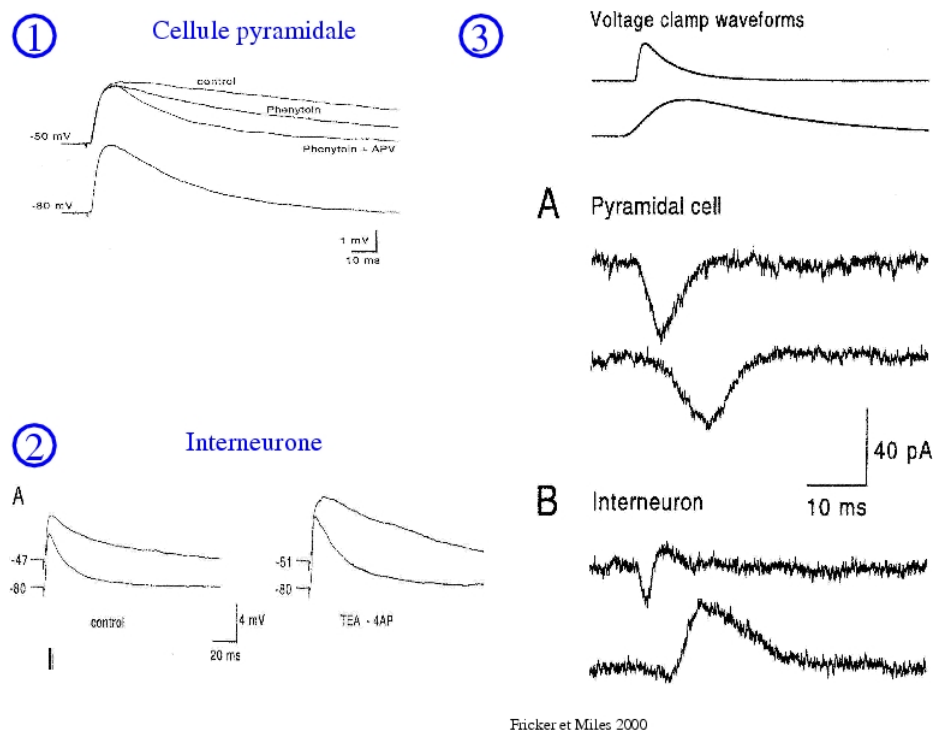


Fig. 3.8: La succession de courants entrant et sortant détermine le décours temporel des PPSE de cellules pyramidales et d'interneurones

PPSE en réponse à une stimulation des voies collatérales de Schaffer dans les cellules pyramidales et dans les interneurones de CA1. (1) La cinétique des PPSE dépend du potentiel de membrane. Le blocage des courants sodiques (phénytoïne) accélère le décours temporel des PPSE et le rend indépendant du potentiel. (2) Le blocage des courants potassiques rallonge le décours temporel des PPSE dans les interneurones. (3) Courants générés pendant l'injection de PPSE artificiel rapide ou lent en potentiel imposé (en haut) dans les cellules pyramidales (A) et dans les interneurones (B). Le courant sortant est beaucoup plus important dans les interneurones ce qui explique la plus grande précision des PPSE dans les interneurones. (Extrait de [Fricker and Miles, 2000])

Certains interneurons du stratum radiatum ont des PPSE au décours temporel lent à l'instar des cellules pyramidales. Comme chez ces dernières, le blocage des récepteurs NMDA accélère le décours temporel des PPSE et les rend similaire des PPSE observés dans les autres interneurons du stratum radiatum [Maccaferri and Dingledine, 2002].

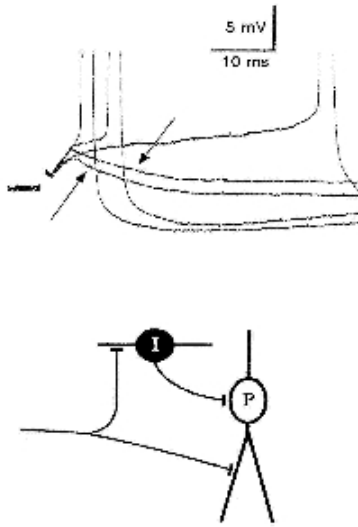
Dans les cellules en grain GABAergiques du bulbe olfactif, le courant I_A , courant potassique transitoire, atténue spécifiquement la dépolarisation rapide causée par les récepteurs AMPA, et ne perturbe pas la dépolarisation plus lente causée par les récepteurs NMDA. I_A joue donc le rôle de filtre entre PPSE rapide AMPA et PPSE lent NMDA [Schoppa and Westbrook, 1999].

Nous avons vu précédemment (2.4.3) que le courant I_H accélère le décours temporel des PPSE dans les cellules pyramidales de CA1 et de la couche 5 en induisant virtuellement par sa désactivation un courant sortant. Le blocage des courants I_H dans les cellules pyramidales de la couche 5 du cortex somatosensoriel diminue la précision de la détection de coïncidence [Berger and Luscher, 2003] (Figure.3.10-3C).

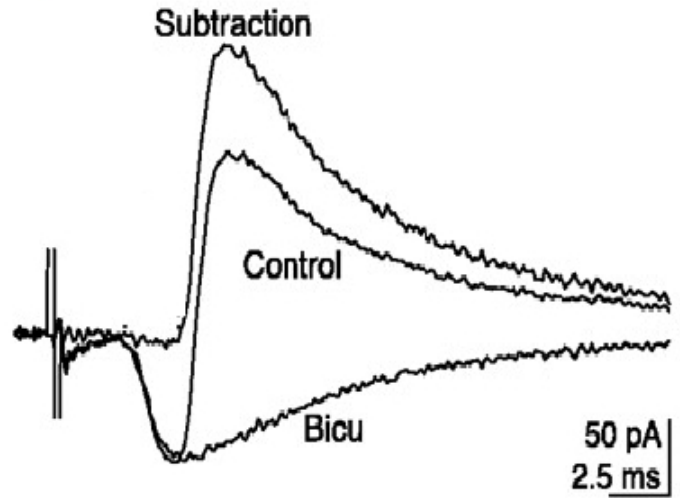
Mise en forme des PPSE par inhibition antérograde Quand la transmission inhibitrice n'est pas bloquée, on observe dans les cellules pyramidales de CA1 une séquence typique PPSE-PPSI pour une même stimulation [Fricker and Miles, 2000]. Le PPSE est monosynaptique, le PPSI correspond à une inhibition antérograde bisynaptique via un interneurone GABAergique. Le courant sortant du PPSI permet d'accélérer très fortement le décours temporel du PPSE dans les cellules pyramidales (Figure. 3.9-(1)). La fenêtre temporelle de décharge de PA définie par cette succession d'un PPSE monosynaptique suivie et d'un PPSI antérograde bisynaptique est inférieure à 2 millisecondes (Figure. 3.9-(3)) [Pouille and Scanziani, 2001].

Le même phénomène d'affinement de l'excitation par une inhibition bisynaptique antérograde via un interneurone a été aussi étudié au niveau des cellules de Purkinje dans le cervelet. Une inhibition antérograde se manifeste aussi au niveau des interneurons affinant encore plus la précision du système. La fenêtre de sommation des PPSE y est aussi réduit entre 1 et 2 ms. L'inhibition antérograde peut inhiber l'effet de PPSE asynchrones jusqu'à 30 ms après un premier PPSE [Mittmann et al., 2005]. Dans le cortex auditif primaire le champ récepteur excitateur recouvre exactement le champ inhibiteur contrairement à ce que prévoirait un modèle classique d'inhibition latérale. En fait l'inhibition succède à l'excitation de quelques millisecondes. On a là un cas d'amélioration de la précision temporelle de décharge par inhibition antérograde dans le cortex sensoriel primaire [Wehr and Zador, 2003].

①

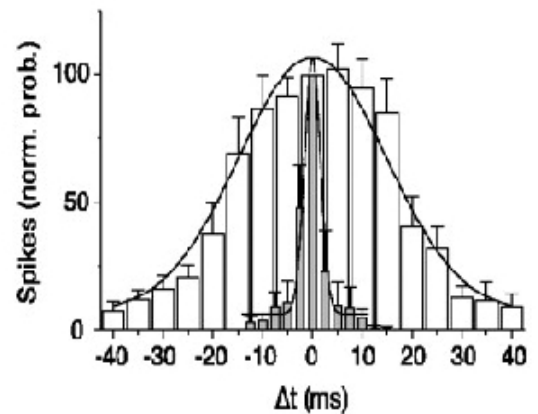
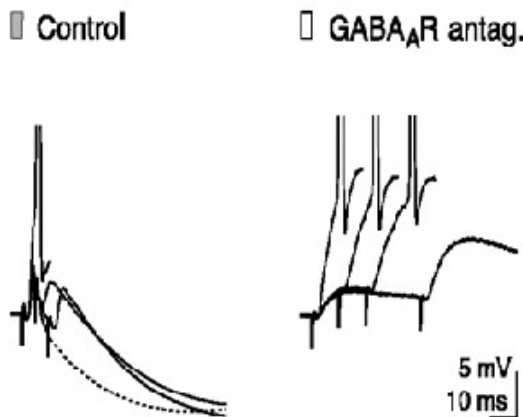


②



③

Fricker et Miles 2000



Pouille et Scanziani 2001

Fig. 3.9: L'inhibition antérograde améliore la précision de décharge suite à un PPSE (1) Séquence PPSE-PPSI typique dans les cellules pyramidales de la stimulation des collatérales de Schaffer : résultat de l'activation d'un PPSE monosynaptique et d'un PPSI bisynaptique via un interneurone (schéma en bas) [Fricker and Miles, 2000]. (2) Dissection des courants pendant la séquence PPSE-PPSI : en contrôle, après blocage de la transmission GABAergique avec bicuculine (20 μ M) et soustraction. (3) Génération de PA suite à la stimulation de deux voies collatérales de Schaffer avec différents délais. En contrôle la décharge de PA est très précise (à gauche, barres grisées dans l'histogramme), quand la transmission GABAergiques est bloquée, la précision devient très faible (à droite, barres blanches) [Pouille and Scanziani, 2001].

En raison du potentiel d'inversion pour le chlore dans les cellules pyramidales, il n'est pas sûr que l'activation des récepteurs $GABA_A$ provoque une hyperpolarisation. Il se pourrait qu'elle se contente d'induire une diminution de la résistance de membrane. Mais même ainsi, l'activation des $GABA_A$ participe à la détection de coïncidence en accélérant le décours temporel des PPSE (Figure.3.10-(1)B;-(3)A,B), à l'instar du courant I_H (voir Figure.3.10-3C) et 2.4.3) .

Les distributions des $GABA_A$ et du courant I_H sur l'axe somato-dendritique sont opposées. Ils agissent de la même manière sur l'intégration des PPSE, en accélérant le décours temporel de ceux-ci, mais n'agissent pas sur les mêmes entrées synaptiques. L'activation des $GABA_A$ s'oppose à l'initiation de PA sodique dans le soma, mais laisse la possibilité de la génération de PA calcique dans les dendrites [Berger and Luscher, 2003].

Décours temporel des PPS et sommation La forme des PPS influence la fenêtre temporelle pendant laquelle ils peuvent se sommer efficacement. Plus le décours temporel des PPS est long, plus ils se sommeront sur une longue période, mais aussi il y aura plus de confusion entre eux. Les courants qui diminuent la constante de temps de membrane et la résistance d'entrée favorisent l'accélération de la repolarisation et donc une meilleure discrimination entre PPS. C'est notamment le cas de l'activation de I_{AHP} dans les cellules pyramidales de CA1 [Lancaster et al., 2001] et de I_H (2.4.3).

Règle générale de la relation entre mise en forme des PPS et précision de décharge

Fricker et Miles proposent une règle générale quant à la définition de la précision de décharge induite par un PPSE : **la précision temporelle de la latence de déclenchement d'un PA en réponse à un changement de potentiel de membrane est défini par l'enchaînement de courant entrant puis sortant** [Fricker and Miles, 2001]. En effet, un courant sortant activé pendant la phase de dépolarisation, qu'il soit synaptique ou intrinsèque, va accélérer celle-ci, augmenter la pente de dépolarisation, et améliorer la précision de décharge. Quant à la phase de repolarisation, un courant sortant activé à temps réduira la durée pendant laquelle le potentiel restera aux abords du seuil. Ce qui améliore également la précision temporelle des déclenchements de PA.

Précision de décharge pendant une activité synaptique à grande variance

On observe particulièrement bien ces règles de précision pendant une intense activité

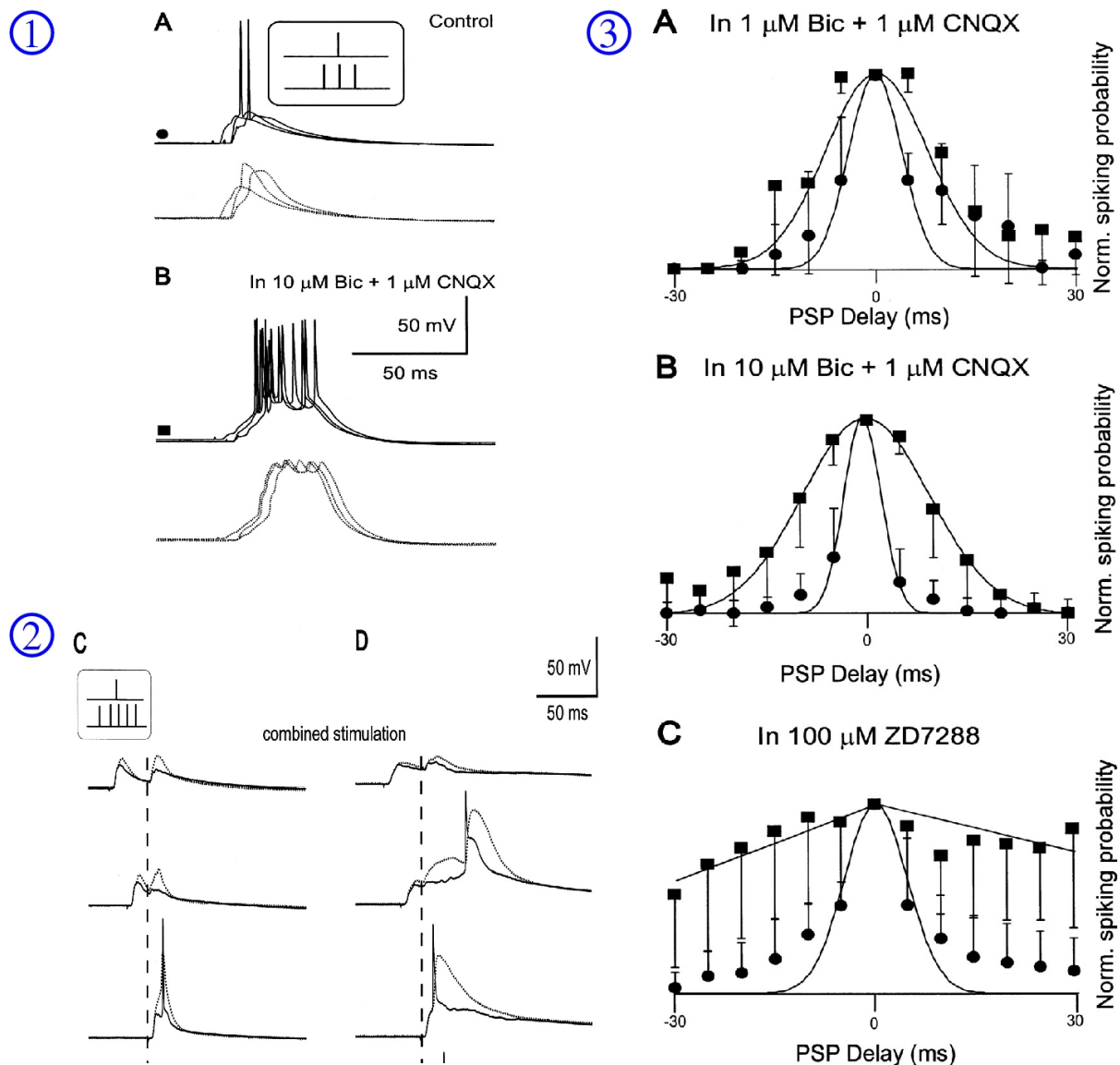


Fig. 3.10: Interaction des récepteurs $GABA_A$ et du courant I_H pour améliorer la précision de la détection de coïncidence

Détection de coïncidence entre événements synaptiques induits dans le soma (traces en trait plein) et dans les dendrites apicales (traces en trait pointillé) avec différents délais. **(1)** Effet du blocage des récepteurs $GABA_A$ sur le déroulement temporel des PPSE. A) contrôle ; B) +10 μM bicuculine + 1 μM CNQX (pour limiter l'augmentation d'excitabilité entraînée par le blocage de l'inhibition) **(2)** Effet du blocage du courant I_H sur le déroulement temporel des PPSE. C) contrôle ; D) +100 μM ZD7288 **(3)** Effet du blocage des $GABA_A R$ (A et B) et du courant I_H (C) sur la précision de la détection de coïncidence. (rond : contrôle ; carré : blocages pharmacologiques) (Extrait de [Berger and Luscher, 2003])

synaptique où se succèdent courants entrant et courants sortants, synaptiques ou intrinsèques.

En effet, un signal d'entrée comprenant une forte variance de conductance produit un patron de décharge beaucoup plus régulièrement reproductible qu'un créneau de courant carré [Mainen and Sejnowski, 1995]. Or quand la variance des entrées synaptiques augmente, la vitesse de dépolarisation est localement plus rapide. L'augmentation de la précision par l'augmentation de la variance correspond en fait à une augmentation locale de la pente de dépolarisation [Axmacher and Miles, 2004]. L'introduction d'un bruit de fond de conductances synaptiques simulées pendant un enregistrement en courant imposé de cellules pyramidales de la couche 5 du cortex accélère le décours temporel et améliore la précision temporel des PPSE, et du couplage E-S [Mittmann et al., 2005]. La réponse-courant à des patrons de potentiel mimant une somme complexe de PPS montre que plus la variance des entrées synaptiques est grande, plus grande est l'activation des courants sortants par rapport aux courants entrants, et donc plus régulières sont les décharges (Figure.3.11). [Axmacher and Miles, 2004].

3.2.3 Synchronisation

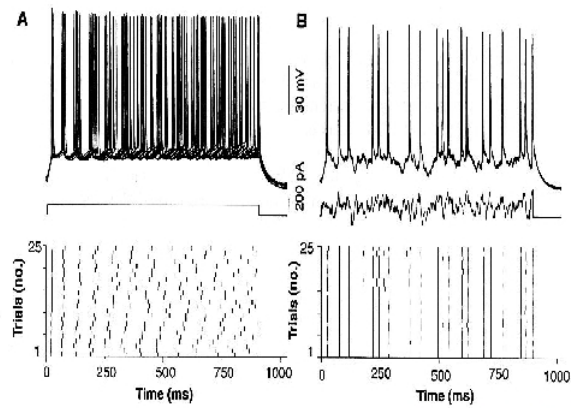
La synchronisation de décharges rythmiques dans un réseau de neurone nécessite à la fois un couplage efficace entre neurones (synapses chimiques et électriques) et des propriétés fréquentielles intrinsèques de chaque neurone qui favorisent le rythme (courants intrinsèques). Fricker et Miles utilisent la métaphore de la synchronisation des applaudissements dans un public particulièrement enthousiaste par une représentation. Pour qu'une telle synchronisation se produise, il faut :

- que le public soit suffisamment motivé (qu'il y ait suffisamment d'entraînement des voies excitatrices)
- qu'il y ait suffisamment d'interaction entre les membres du public (interactions entre neurones)
- et que le public ait l'habitude d'applaudir à peu près au même rythme (que la population de neurone soit homogène) [Fricker and Miles, 2001].

Des modèles théoriques appuyés sur des enregistrements sonores d'applaudissement ont en effet rendu compte d'une certaine diversité culturelle entre différents publics qui se synchronisent ou non, et plus ou moins vite. Ils montrent que ces trois critères jouent bien chacun un rôle critique dans la synchronisation des applaudissements [Néda et al., 2000].

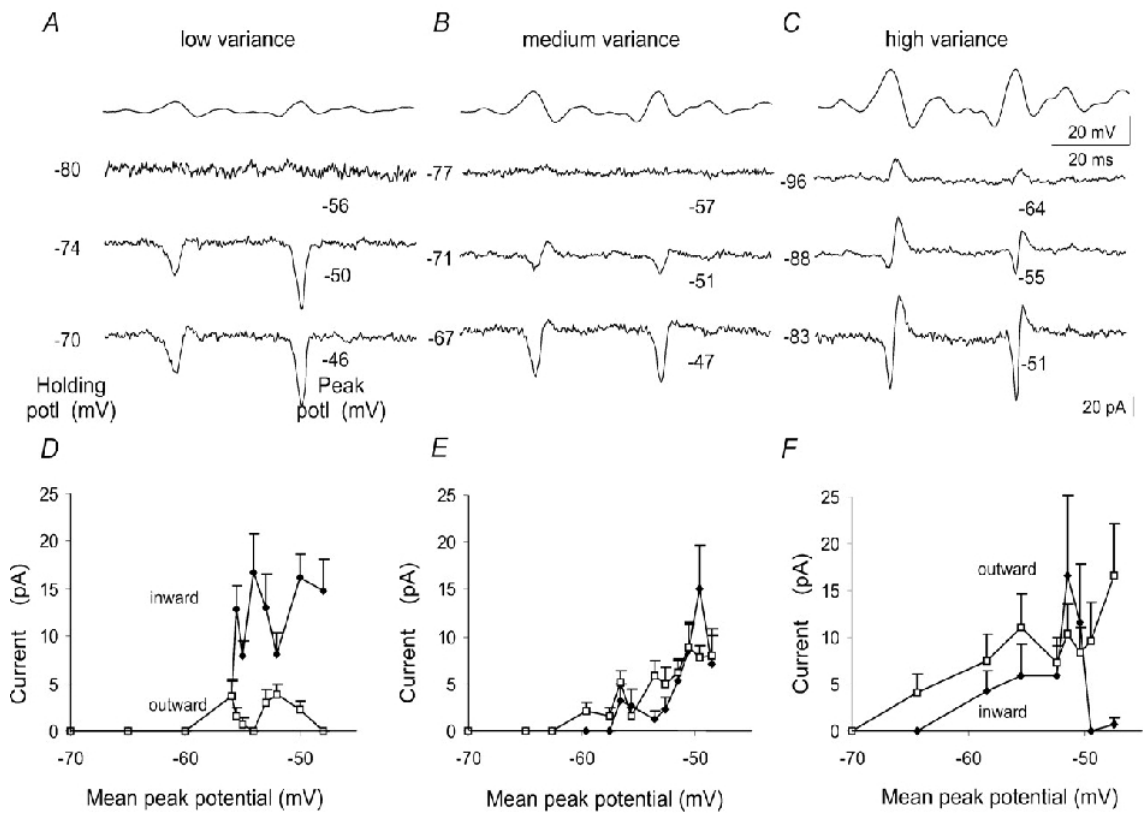
La synchronisation rythmique des décharges d'un grand nombre de cellules induit des oscillations bien observables par EEG. Elles sont reliées à différents comportements :

①



Mainen et Sejnowski 1995

②



Axmacher et Miles 2004

Fig. 3.11: L'activation de courants entrant et sortant pendant une activité synaptique à forte variance augmente la précision de décharge

(1) La réponse à un courant comportant une forte variance est beaucoup plus régulière que celle à un créneau carré de courant [Mainen and Sejnowski, 1995]. (2) Plus la variance du potentiel imposé est grande, plus la proportion de courant sortant par rapport au courant entrant est grande. En haut, potentiel imposé avec des variance croissante de A à C. Au milieu, Courants générés en réponse au potentiel imposé, à différents potentiels de membrane médian. En bas, proportion de courant sortant (carré blanc) et de courant entrant (rond noir) [Axmacher and Miles, 2004].

- basses fréquences (0.5-20Hz), oscillations irrégulières liées au sommeil (onde lente du sommeil)
- fréquences θ (5-10Hz), liées au comportement exploratoire et au sommeil paradoxal
- fréquences γ (40-100Hz), liées au comportement exploratoire et au sommeil paradoxal

L'activité rythmique corticale peut être disséquée en deux parties : une composante à basse fréquence qui détermine l'excitabilité de la cellule, et une composante à haute fréquence qui détermine la précision de la décharge [Elhilali et al., 2004][Hasenstaub et al., 2005]. La composante à haute fréquence est dominée par les PPSI qui sont produits par des interneurons GABAergiques capables de décharger et d'assurer la transmission synaptique sur un large spectre de fréquence (de 2 à 100 Hz) [Hasenstaub et al., 2005]. La décharge des PPSI est très synchronisée à travers un réseau d'interneurons étroitement couplés par des synapses électriques et chimiques [Galarreta and Hestrin, 1999][Csicsvari et al., 2003][Galarreta and Hestrin, 2002]. L'injection de courant mimant différent type d'activité synaptique dans des neurones montre que quelques soient les propriétés de décharge des neurones testés les basses fréquences ont plus d'effet sur le potentiel de membrane que les hautes fréquences. Mais augmenter la puissance des fréquences γ dans le signal injecté améliore la précision de décharge. On peut donc attribuer différents rôles à chaque spectre de fréquence : les basses fréquences dirigent l'amplitude de dépolarisation et ouvrent la fenêtre temporelle pendant laquelle la décharge d'un PA est la plus probable ; les hautes fréquences assurent la précision de décharge [Nowak et al., 1997].

Précession de phase

Quand l'animal s'approche du "champ de lieu" (*place field*), le neurone de lieu correspondant décharge de manière de plus en plus précoce par rapport à la phase des oscillations θ . Il s'agit d'un des exemples les plus clairs de codage temporel par rapport à la phase d'une oscillation de réseau dans le SNC mammifère [Magee, 2003]. Pendant les oscillations θ , les dendrites apicales reçoivent une forte activité synaptique excitatrice dans les dendrites apicales et inhibitrice autour du soma. La précession de phase a lieu quand l'excitation dépasse l'inhibition de telle sorte que la décharge a lieu plus tôt. Les courants intrinsèques présents dans les dendrites définissent exactement la force excitatrice nécessaire pour induire une précession de phase. En effet, après blocage du courant I_H la dépolarisation nécessaire pour induire une même précession de phase est moindre (Figure.3.12) [Magee, 2001].

De plus les PPSE générés par la voie perforante temporoammonique dans les dendrites apicales des cellules pyramidales de CA1 ne se propagent en général pas au-delà à cause d'une inhibition antérograde. Mais ils peuvent se propager lorsqu'ils sont précédés

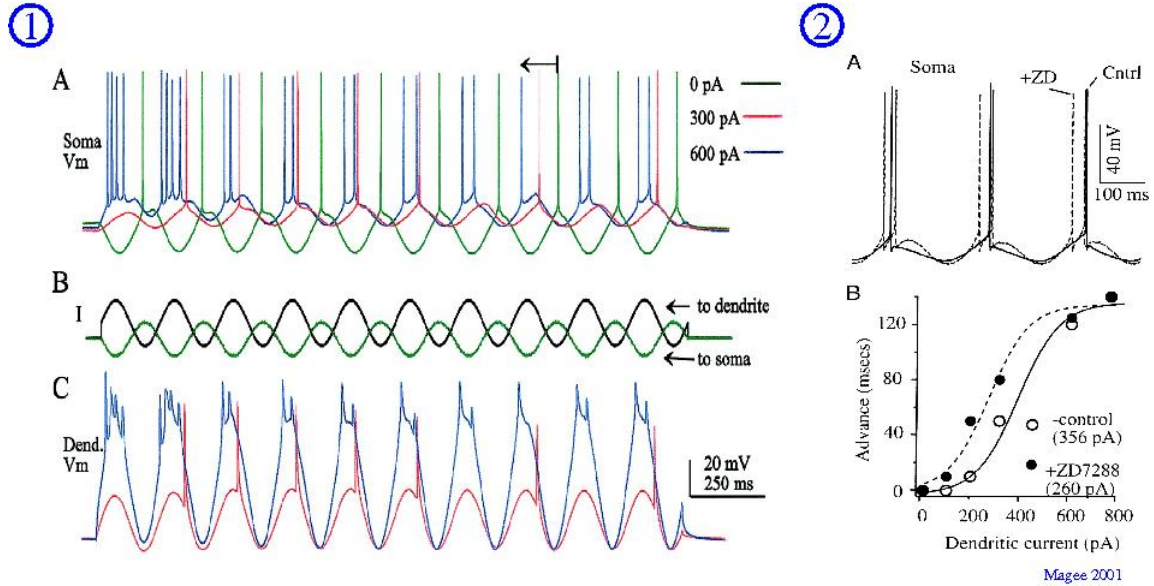


Fig. 3.12: Codage par précession de phase par rapport à l'oscillation θ et I_H

Illustration du mécanisme de la précession de phase dans les cellules pyramidales de CA1 : **(1)** A) : Réponse à un courants sinusoïdal (5 Hz) injectés dans le soma (200 pA) (vert) ; Réponse à des courants sinusoïdaux injectés en opposition de phase dans le soma et dans les dendrites (300 pA ; à 300 μm du soma) (rouge) ; plus forte amplitude de courant injecté dans les dendrites (600 pA) (bleu) ; B) : Courants injectés dans le soma (en vert) et dans les dendrites (en noir) en opposition de phase. C) : Potentiel de membrane dans les dendrites. **(2)** Le blocage du courant I_H diminue l'intensité du courant à injecter pour obtenir la même précession de phase des décharges. A) Exemple de précession de phase avec injection de courant sinusoïdal en opposition de phase dans le soma (100 pA) et dans les dendrites (300 pA), avant (trait plein) et après (trait pointillé) blocage du courat I_H par ZD7288 (30 μM). B) Précession de phase en fonction de l'amplitude de courant injecté dans les dendrites.

Extrait de [Magee, 2001].

par une activité originaire des collatérales de Schaffer dans un délai d'un demi cycle θ . On a affaire à un exemple de porte logique "ET" en phase avec les oscillations θ [Ang et al., 2005].

3.3 Les oscillations θ et le courant I_H dans les structures corticales

Les oscillations θ correspondent au même domaine d'analyse temporel propre au courant I_H dans les cellules corticales (5 à 10 Hz, c'est à dire de 250 à 100 ms). Et en effet plusieurs études convergent pour attribuer au courant I_H un rôle important dans la génération et la synchronisation des oscillations θ dans les structures corticales. Il s'agit donc d'un modèle intéressant pour illustrer le rôle d'un courant intrinsèque dans l'organisation temporelle du codage neural à plusieurs niveau, depuis des sous-compartiments cellulaires jusqu'au réseau.

3.3.1 Description des rythmes θ

Mécanismes de génération des oscillations θ

Les oscillations θ sont observées pendant le sommeil paradoxal, mais aussi chez des sujets dans des activités locomotrices de type exploratoire. Il est probable que les oscillations θ soient impliquées dans des phénomènes mnésiques. Les oscillations θ dans l'hippocampe sont intégrées à un réseau qui comporte le septum médian-bande diagonal de Broca (MS-DBB) et le cortex entorhinal. La section des afférences provenant de ces deux structures peut réduire l'amplitude des oscillations θ ou les faire disparaître [Buzsáki, 2002]. On a néanmoins observé des oscillations θ dans des hippocampes isolés. Le CA3 est alors essentiel [Fellous and Sejnowski, 2000]. La génération des oscillations θ dans l'hippocampe est donc possible de manière endogène, mais est le plus souvent entraînée par des projections cholinergiques en provenance du septum ou glutamatergiques en provenance du cortex entorhinal. Des caractéristiques intrinsèques de résonance des cellules et du circuit local permettent aux oscillations de se prolonger [Buzsáki, 2002].

Patrons de décharges des différents types cellulaires pendant un cycle θ

L'analyse des patrons de décharge de différents types cellulaires de la région CA1 pendant les oscillations θ montre combien chaque type cellulaire présente

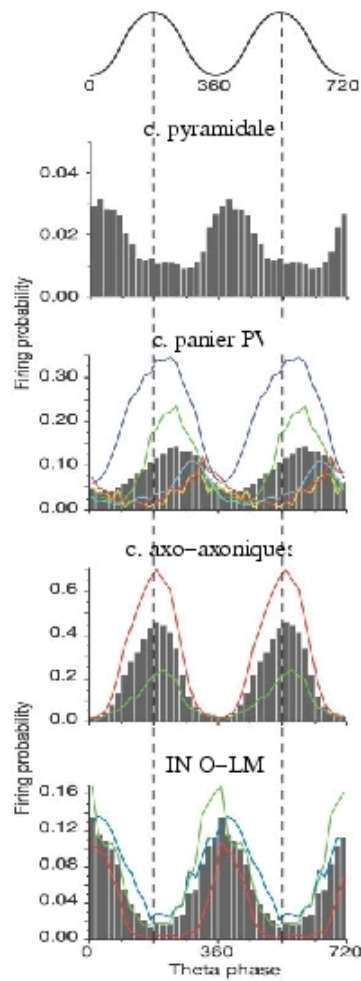
un patron de décharge spécifique en phase avec un cycle d'oscillation θ [Klausberger et al., 2003][Klausberger et al., 2004]. Le maximum de probabilité de décharge chez les **cellules pyramidales** se situe pendant la phase montante des oscillations du champ de potentiel (20° de décalage de phase) (voir 3.13-(1)). Les **cellules paniers**, des interneurons à parvalbumine qui projettent sur le soma et dans la région proximale des pyramidales, déchargent pendant la phase descendante des oscillations du champ de potentiel (voir 3.13-(1)). Les **cellules axo-axoniques** dont les boutons synaptiques ciblent le segment initial de l'axone des pyramidales déchargent préférentiellement juste après le pic de l'oscillation θ (voir 3.13-(1)). Pour ces deux types d'interneurons, le maximum de décharge a lieu pendant le minimum de décharge des pyramidales et le maximum de puissance des fréquences γ . Elles pourraient provoquer un entraînement rythmique de décharge en rebond, à l'instar des PPSI synchronisant (voir Figure.3.7) [Klausberger et al., 2003]. Les premiers agissent au niveau du soma, les seconds au niveau du segment initial de l'axone. Les **interneurons situés entre les *stratum oriens* et *stratum moleculare* (IN O-LM)** dont les projections ciblent les dendrites distales des pyramidales déchargent essentiellement pendant le creux de l'oscillation θ (voir 3.13-(1)), quasiment en même temps que les pyramidales. Elles permettent ainsi de moduler l'effet de l'excitation en provenance de voies perforantes selon la phase de θ et/ou d'établir dans l'arbre dendritique une hyperpolarisation rythmique qui désactive des courants, calciques notamment, qui facilitent la rétropropagation de PA. Elles jouent donc un rôle dans le codage de la précession de phase propre aux cellules de lieu [Klausberger et al., 2003]. Les **interneurons bistratifiés** qui projettent des synapses inhibitrices sur les pyramidales, déchargent à haute fréquence 1 à 2 ms après les pyramidales (voir 3.13-(2)). Leur maximum de probabilité de décharges correspond à la phase d'hyperpolarisation des pyramidales. On retrouve ici, dans des conditions synchrones, l'inhibition antérograde que nous avons décrite précédemment (voir 3.2.2) [Klausberger et al., 2004].

3.3.2 Rôle de I_H dans la génération et la synchronisation des rythmes θ : données expérimentales

Liens fonctionnels entre le courant I_H et les oscillations θ

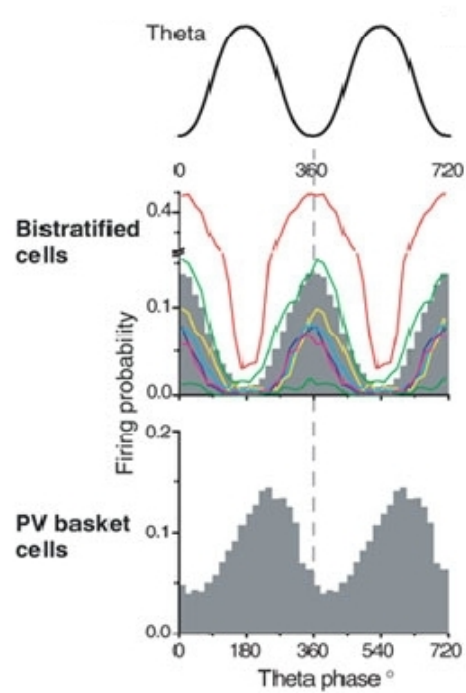
La stimulation de bouffée d'activité à fréquence θ dans les collatérales de Schaffer projetant sur les cellules pyramidales de CA1 induit une diminution à long terme de l'excitabilité dans les dendrites. Cette diminution correspond à une augmentation de la conductance I_H , laquelle semble être due à une augmentation de l'expression des protéines HCN [Fan et al., 2005].

①



Klausberger et al. 2003

②



Klausberger et al. 2004

Fig. 3.13: Patrons de décharges des différents types cellulaires pendant un cycle θ
 Probabilité de décharge de différents type de neurone de CA1 pendant un cycle d'oscillation θ .
 Lignes de couleurs : cellule individuelle ; Barres d'histogramme : moyenne sur plusieurs cellules.
 Extrait de [Klausberger et al., 2003][Klausberger et al., 2004].

Nous avons décrit précédemment comment le courant I_H dans l'arbre dendritique des cellules pyramidales de CA1 définit finement l'importance de l'excitation nécessaire pour provoquer une précession de phase impliquée dans le codage de la localisation spatiale (Figure.3.12) [Magee, 2001].

Effet du blocage de I_H sur les oscillations θ *in vivo*

La perfusion locale de ZD7288 dans le MS-DBB diminue les bouffées d'oscillations θ liées aux comportements exploratoires chez des rats actifs [Xu et al., 2004]. L'injection *in vivo* de Caesium dans la couche des dendrites apicales de la région CA1 diminue drastiquement la puissance des oscillations θ extracellulaires (90% de diminution 10 min après injection) [Kitayama et al., 2002].

Chez une lignée de rat dont l'expression du gène HCN1 a été bloquée sélectivement dans le télencéphale, les oscillations θ ont toujours lieu mais avec une légère diminution de puissance. Les résultats en provenance de modèle animaux KO sont néanmoins critiquables, car certainement de nombreux mécanismes de compensation ont pu se mettre en place pendant le développement pour maintenir un mécanisme aussi important physiologiquement [Nolan et al., 2004].

Effet du blocage de I_H sur les oscillations θ *in vitro*

L'application de ZD7288 (10 μM) sur une tranche d'hippocampe dans laquelle des oscillations θ résistantes à l'atropine ont été induites par activation des récepteurs NMDA et l'inhibition des récepteurs AMPA fait disparaître les oscillations θ des enregistrements en potentiel de champ [Gillies et al., 2002].

Cobb et al. ont observé la disparition des oscillations θ *in vitro* après ajout de ZD7288 [Cobb et al., 2003] (Figure.3.14-A,B). Mais la concentration de ZD7288 utilisée est telle (100 μM) qu'elle agit aussi sur la transmission synaptique. En effet, 50 μM de ZD7288 diminue déjà l'amplitude des PPSE évoqués dans les pyramidales de CA1 par stimulation des collatérales de Schaffer de 90 % [Chevalleyre and Castillo, 2002] (Figure.3.14-C). L'utilisation de Cs^+ (2,5 mM) fait aussi disparaître les oscillations θ . Mais alors on ne peut discriminer entre l'effet du blocage du courant I_H et celui des courants I_{KIR} .

Des oscillations "d'environ 10 Hz" apparaissent *in vitro* dans le cortex moteur en absence d'inhibition. Elles sont supprimées après blocage des courants $I_{Na,P}$ ou I_M . Le blocage des courants I_{CaT} ou I_H ne fait pas disparaître les oscillations [Castro-Alamancos et al., 2007]. On observe néanmoins après blocage de I_H , à l'instar de notre étude, une désorganisation des oscillations que les auteurs de l'étude n'ont pas relevée (Figure.3.15).

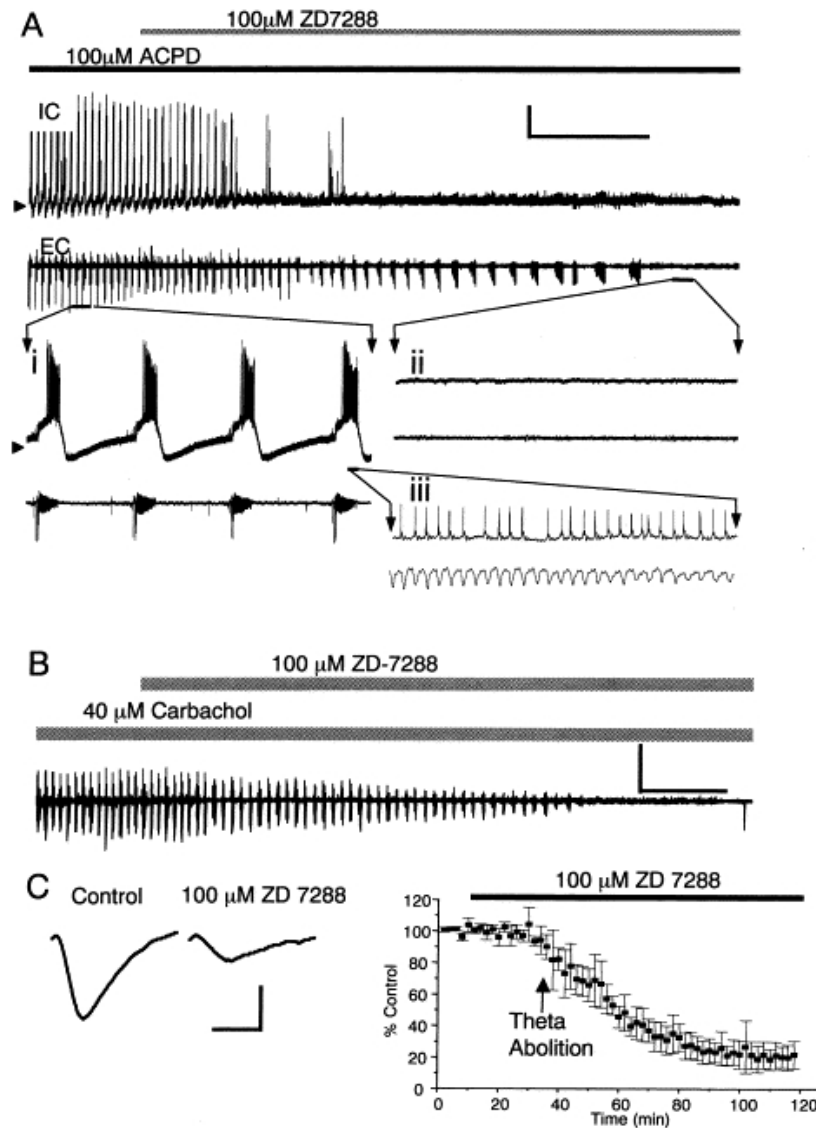


Fig. 3.14: Disparition des oscillations θ dans l'hippocampe après application de ZD7288 (100 μ M)

A) L'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluR) par ACPD induit des oscillations à fréquence θ dans le CA3. L'ajout de ZD7288 à 100 μ M fait disparaître les oscillations. Mesures simultanées d'une cellule pyramidale en courant imposé cellule entière (IC) et du champ de potentiel extracellulaire voisin (EC).

B) L'activation des récepteurs muscariniques par carbachol induit des oscillations θ . L'ajout de ZD7288 fait les disparaître.

C) PPSE de champ évoqués avant et après application de ZD7288. À droite, variation de l'amplitude des PPSE de champ pendant l'application de ZD7288 (n=4).

[Cobb et al., 2003]

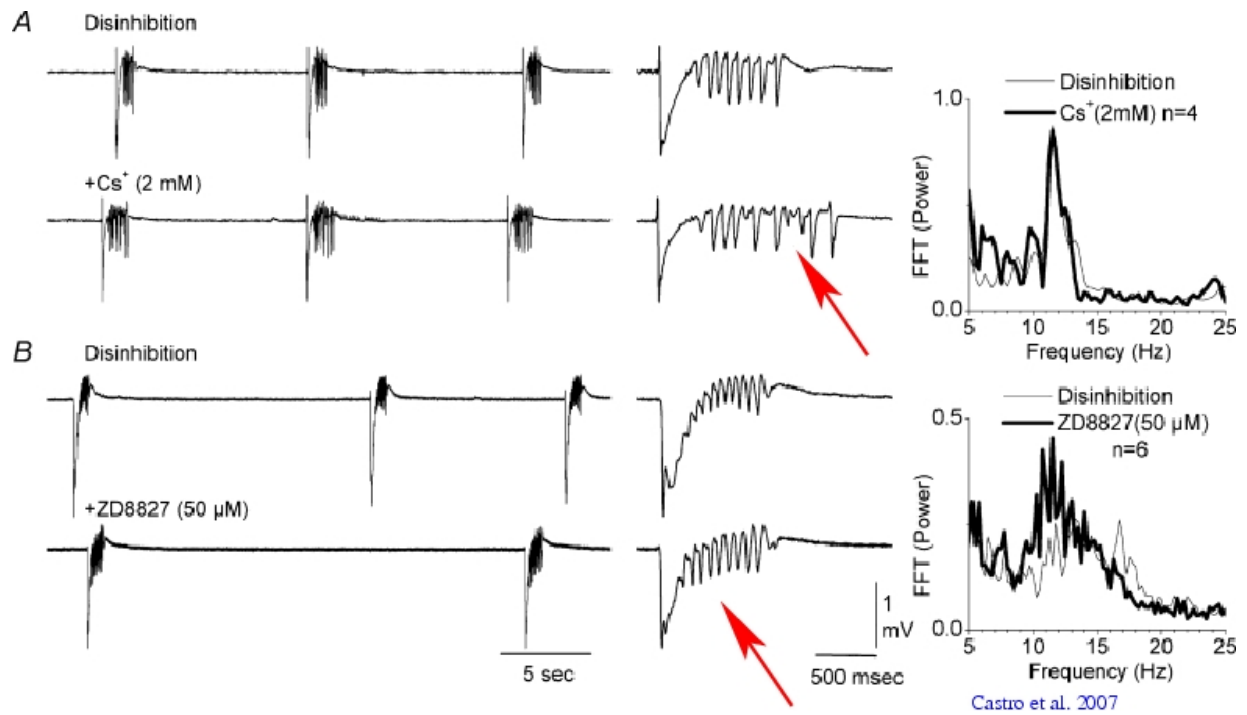


Fig. 3.15: Désorganisation des oscillations θ dans le cortex moteur après blocage du courant I_H

À gauche : Apparition d'oscillation "d'environ 10 HZ" après blocage de l'inhibition ($GABA_A$ et $GABA_B$);

A) Application de Cs^+ , l'oscillation se maintient. On observe une désorganisation (flèche rouge).

B) Application de ZD7288, l'oscillation se maintient.

À droite : Transformée de Fourier, la composition fréquentielle du signal reste essentiellement la même après blocage du courant I_H . [Castro-Alamancos et al., 2007]

Le courant I_H est donc impliqué dans des mécanismes fonctionnels où des oscillations à fréquence θ sont en jeu, comme le codage par précession de phase et la plasticité de l'excitabilité intrinsèque induite par des bouffées θ . De plus, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, plusieurs études montrent que le blocage du courant I_H perturbe les oscillations θ dans l'hippocampe ou le néocortex. Néanmoins il reste difficile de conclure sur la spécificité de l'effet du courant I_H sur les oscillations θ . Dans certaines études, les oscillations θ disparaissent, mais il est difficile de garantir que seul le blocage du courant I_H en est responsable. Dans d'autres cas, les oscillations θ semblent peu perturbées par le blocage du courant I_H , même si, comme nous le faisons dans notre étude, une analyse plus fine des oscillations θ pourrait révéler des différences qualitatives.

3.3.3 Mécanismes au niveau cellulaire par lesquels le courant I_H peut participer à la génération et à la synchronisation d'oscillations θ

Le rôle du courant I_H dans plusieurs mécanismes importants pouvant participer à la génération et la synchronisation d'oscillations à fréquence θ a été identifié.

Le courant I_H , courant générateur de rythmes θ

Il a été démontré que le courant I_H participe à la génération de décharges périodiques dans le spectre de fréquence θ dans plusieurs types cellulaires. Ces cellules constitueraient les générateurs du rythme θ .

Interneurones générateurs de rythme θ dans le septum Les interneurones septo-hippocampaux expriment un fort courant I_H [Morris et al., 2004]. Le blocage du courant I_H fait cesser la décharge régulière des interneurones septo-hippocampaux GABAergiques, mais n'a pas d'effet sur les interneurones septo-hippocampaux cholinergiques [Xu et al., 2004]. Le septum constitue une des sources motrices des oscillations θ dans l'hippocampe. En effet la section des connexions septo-hippocampales diminue l'amplitude des oscillations θ hippocampales, et peut les faire disparaître [Fischer et al., 1999][Buzsáki, 2002].

Dans les interneurones O/A Les interneurones situés entre le stratum oriens et l'alveus (interneurones O/A, neurones orientés horizontalement dont les dendrites sont confinés dans le stratum oriens) sont capables de décharger régulièrement de

manière spontanée sans excitation. Le blocage du courant I_H par ZD7288 réduit la fréquence de décharge en allongeant l'intervalle entre décharge (*interspike interval* ISI) [Maccaferri and McBain, 1996][Gillies et al., 2002]. L'activation des récepteurs β -adrénergiques (isoprenaline) potentialise le courant I_H et augmente la fréquence de décharge spontanée en réduisant l'ISI et en accélérant la pente de repolarisation de la post-hyperpolarisation (AHP *after hyperpolarization*) [Maccaferri and McBain, 1996].

Il n'a néanmoins pas été établi si la précision de décharge d'un PA à la suite d'une AHP est affectée.

Résonance à fréquence θ et courant I_H

Oscillations infraliminaires θ dans les cellules étoilées de la couche II du cortex entorhinal Les neurones étoilés de la couche II du cortex entorhinal sont la principale origine des entrées perforantes dans l'hippocampe (avec le septum). On y observe par des enregistrements en mode cellule entière et en courant imposé des oscillations subliminaires à une fréquence d'environ 3 Hz à température ambiante (24°C)². Ces cellules ont un courant I_H , actif au potentiel de repos, et relativement rapide (essentiellement HCN1, et un peu de HCN2) [Notomi and Shigemoto, 2004]. Le blocage de I_H avec du ZD7288 annihile les oscillations. Le blocage des autres courants potassiques avec du Ba^+ extracellulaire augmente la synchronisation des oscillations subliminaires. Il a déjà été montré que I_{NaP} est aussi impliqué dans ces oscillations. En réalisant un modèle comprenant à la fois I_H et I_{NaP} , on obtient un système qui oscille spontanément. On montre par ce modèle que la conductance I_H est maximale peu après le creux de l'oscillation lequel correspond au minimum de conductance I_{NaP} . C'est ce décalage entre l'oscillation et l'activation de I_H qui maintient l'oscillation [Dickson et al., 2000].

Neurones où il a été démontré que I_H définit une fréquence de résonance θ Comme nous l'avons décrit plus haut (3.2.1), le courant I_H participe à la résonance à des fréquences θ de nombreux types cellulaires impliqués dans les oscillations θ : chez les cellules pyramidales de CA1 [Hu et al., 2002] et chez d'autres neurones de CA1 [Leung and Yu, 1998], chez les cellules pyramidales néocorticales de la couche 5 [Ulrich, 2002], chez les cellules pyramidales du subiculum [Wang et al., 2006].

La réponse à des signaux rythmiques infraliminaires arrivant à une fréquence proche de celle de résonance est plus grande que pour d'autres fréquences [Hutcheon and Yarom, 2000]. Les cellules déchargent aussi plus facilement en réponse

²On peut s'attendre à une fréquence plus haute à température physiologique

à un signal proche de la fréquence de résonance [Pike et al., 2000] (voir aussi Tableau.3.1).

La fréquence de résonance des interneurons hippocampaux, notamment ceux dont la participation à la génération d'oscillation θ à été identifié, comme les interneurons O/A, n'a pas été spécifiquement décrite, ni leur dépendance au courant I_H .

Synchronisation en réponse à des PPSI Cobb et al. montrèrent comment l'initiation de PPSI à un potentiel de membrane proche du seuil de déclenchement peut provoquer la synchronisation des décharges en rebond [Cobb et al., 1995]. Depuis, il apparaît de plus en plus certain que l'activité synaptique GABAergique est essentielle dans la synchronisation des cellules pyramidales [Klausberger et al., 2003]. De nombreux auteurs supposent le rôle clef de I_H dans la synchronisation de l'activité de réseau en réponse à l'inhibition, comme cela apparaît de manière pathologique dans les modèles d'épilepsie induite par crise fébrile où on observe à la fois une augmentation de l'activité GABAergique et une augmentation de la conductance I_H [Brewster et al., 2002].

Un certains nombres de mécanismes par lesquels le courant I_H pourrait jouer un rôle dans la génération et la synchronisation d'oscillations θ ont été déjà décrite. Il s'agit de la capacité de certaines cellules de décharger spontanément à la fréquence θ , des caractéristiques de résonance infraliminaire des neurones. D'autres peuvent être proposées à partir de la connaissance actuelle sur l'architecture du réseau responsable des oscillations θ . Il s'agit essentiellement de la précision temporelle du couplage entre transmission synaptique et décharge de PA, qu'il s'agisse de PPSI ou de PPSE.

3.3.4 Modèles informatiques

Deux études de simulation numérique ont illustré comment le courant I_H peut être un élément majeur dans les mécanismes de génération et de synchronisation d'oscillations θ dans la région CA1 de l'hippocampe [Rotstein et al., 2005][Orban et al., 2006].

La première [Rotstein et al., 2005] consiste en un réseau constitué d'interneurone situés entre la *lacunosum moleculare* et le *stratum oriens* (O-LM, ici appelée cellule O) et d'interneurones à décharge rapide (*Fast Spiking*, ici appelée cellule I). Un réseau composé exclusivement de cellule O n'est pas capable d'établir d'oscillations à une fréquence θ . L'introduction d'une inhibition d'une cellule I permet la synchronisation de deux cellules O. De par les propriétés cinétique du courant I_H dans les cellules O, celles-ci se synchronisent si elles reçoivent des inhibitions à des fréquences θ . La mise en place d'une inhibition en retour des cellules O sur les cellules I par des synapses GABA lentes renforce

la robustesse du rythme θ en obligeant les cellules I à décharger à des fréquences θ . L'étude *in vitro* d'oscillations θ résistantes à l'atropine montre que chaque cellule ne décharge pas forcément à chaque période [Gillies et al., 2002]. Un réseau de cellule I et O plus grand avec différentes forces synaptiques pour chaque couple I/O reproduit dans une certaine mesure cette robustesse de l'oscillation de réseau sans que chaque cellule ne participe à chaque période. Il s'agit d'une "synchronisation irrégulière" ou "synchronisation de guingois" (*ragged synchronization*). Cette étude montre comment les propriétés intrinsèques de résonance des interneurons définies par I_H peuvent participer à l'établissement d'oscillations.

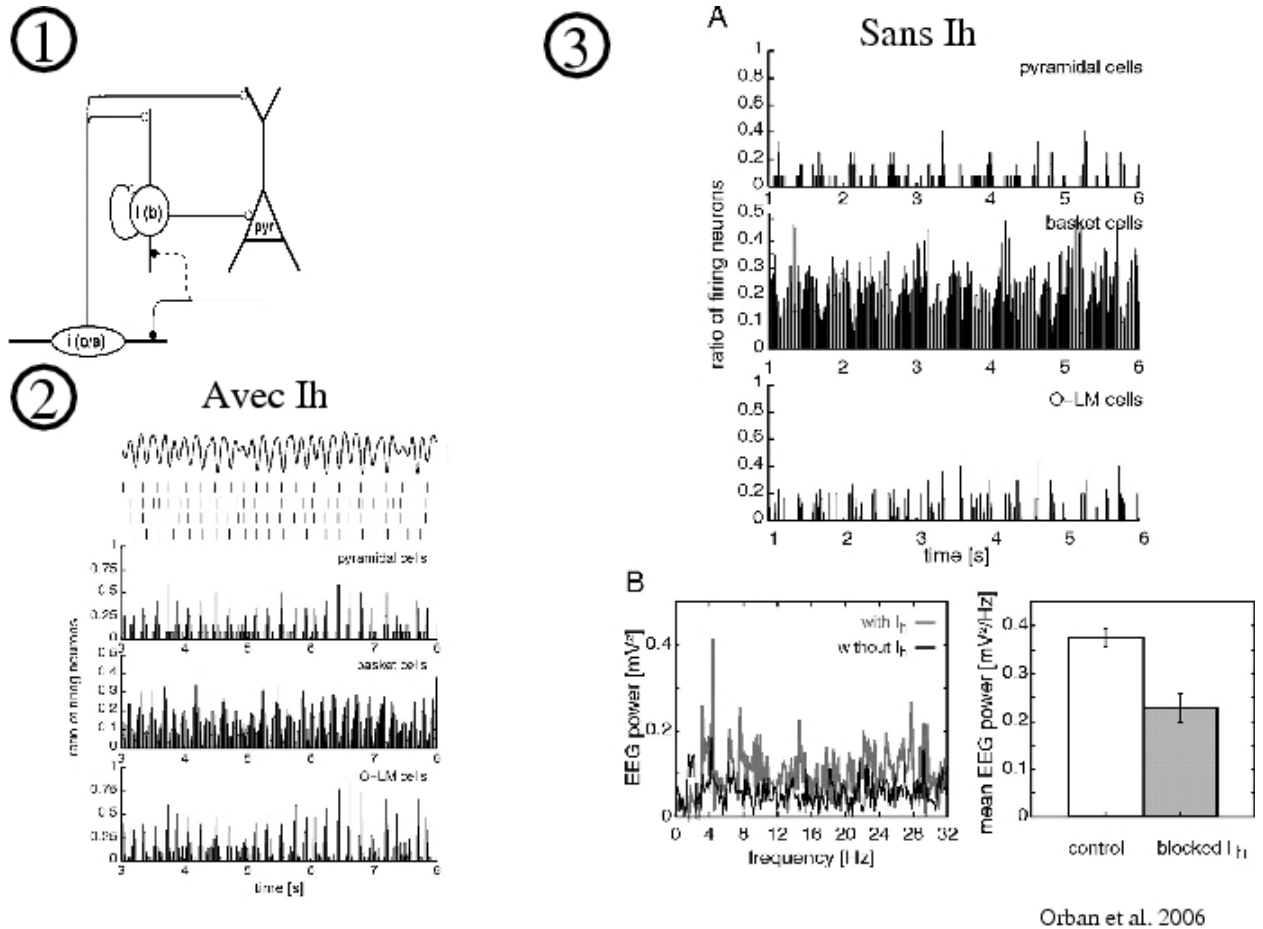
La seconde étude de modélisation [Orban et al., 2006] prend en compte trois types de cellules : des interneurons situés entre la *lacunosum moleculare* et le *stratum oriens* (O-LM), des Cellules-paniers (*basket cells*) et des cellules pyramidales. Les interneurons projettent des synapses GABAergiques sur les cellules-paniers et sur les cellules pyramidales et ces dernières renvoient des projections NMDA sur les interneurons O-LM. Ce modèle reproduit correctement des phénomènes observés *in vivo* comme la décharge des cellules pyramidales après la mise en silence des interneurons O-LM (Figure.3.16-1). Le modèle comporte un réseau de plusieurs cellules modélisées en plusieurs compartiments pour les cellules pyramidales et en compartiment unique pour les deux types d'interneurone. Le courant I_H est intégré aux cellules pyramidales et aux interneurons O-LM. Pour les cellules pyramidales, le gradient somato-dendritique d'expression du courant I_H est respecté [Lörincz et al., 2002][Magee, 1999]. Le réseau est constitué de 100 cellules-paniers, 70 interneurons O-LM, et 15 cellules pyramidales dans la plupart de simulation. Les connexions synaptiques sont éparpillées aléatoirement en respectant les données anatomiques. Le modèle permet de déduire la génération d'un champ électrique extracellulaire de l'activité des cellules pyramidales.

Le modèle permet de produire *in silico* des oscillations θ comparables à celles obtenues *in vitro* par activation des récepteurs glutamatergiques NMDA à l'exclusion des récepteurs AMPA [Gillies et al., 2002] (Figure.3.16-2). La suppression du courant I_H fait quasiment disparaître les fréquences θ (Figure.3.16-3). Le modèle permet en plus de décrire un des mécanismes par lesquels le courant I_H participe à la synchronisation du réseau aux fréquences θ : la décharge des cellules pyramidales en rebond d'inhibition due à la lente désactivation du courant I_H telle qu'elle est observée par Cobb [Cobb et al., 1995] y est reproduite. Le courant I_H détermine la précision de la décharge en rebond. La suppression du courant I_H de la simulation augmente le délai de décharge après un PPSI et décuple l'écart type correspondant.

Le second modèle a l'avantage de modéliser les connexions synaptiques de manière plus réaliste, (dans le premier modèle, chaque neurone d'un type est connecté avec chaque

neurone de l'autre type ; dans le second, il y a une connectivité dispersée) et de prendre en compte les synapses glutamatergiques qui sont justement responsables des oscillations θ résistantes à l'atropine. Le premier modèle est cependant une bonne illustration des processus par lesquels le courant I_H peut participer à la synchronisation d'un réseau. Il a notamment l'avantage de montrer le réseau minimale conduisant à une oscillation, et que la robustesse du réseau augmente avec sa complexité. Ces résultats annoncent *in silico* notre étude *in vitro*.

Le courant I_H est donc un courant membranaire qui intervient dans des phénomènes infraliminaires sur des échelles de temps relativement longue, entre quelques centaines de millisecondes et quelques secondes. Son rôle dans l'intégration dendritique a été particulièrement bien décrit. L'organisation temporelle de l'activité de réseau dépend de la précision temporelle à laquelle s'effectue la transmission synaptique et son couplage à une décharge. L'oscillation rythmique d'une population de cellule, comme les oscillations θ , est un exemple de la synchronisation qui peut résulter de cette organisation temporelle. Le blocage du courant I_H semble perturber les oscillations θ , même s'il l'on ne peut pas encore dire dans quelle mesure et par quels mécanismes. Parmi ces mécanismes possibles, les propriétés de rythmogenèse spontanée d'un certain nombre de cellules comme les interneurones septo-hippocampaux GABAergiques et les interneurones du *stratum oriens* a déjà été décrit. Le courant I_H attribue également aux cellules qui l'expriment une fréquence de résonance θ , notamment les cellules pyramidales de CA1 et de la couche 5 du néocortex. Enfin, les PPSI peuvent synchroniser les décharges à leur suite. Il est probable que le courant I_H participe à ce phénomène. De même que la mise en forme des PPSE par le courant I_H doit permettre une amélioration de la précision du couplage E-S. Des études de simulations numériques décrivent ces mécanismes.



Orban et al. 2006

Fig. 3.16: Modèle informatique indiquant le rôle de I_H dans la synchronisation des oscillations θ dans l'hippocampe

(1) Schéma de base du modèle numérique composé de cellules pyramidales, d'interneurones du stratum oriens et des cellules paniers. Synapses GABAergiques symbolisées par des cercles vides, Synapses glutamatergiques par des cercles pleins. (2) Histogrammes des probabilités de décharge des trois types cellulaires quand I_H est intégré au modèle. (3) A) Même histogramme quand I_H n'est pas présent dans la modélisation. B) Spectre de puissance des fréquences avec I_H (en noir) et sans I_H (en gris).

Extrait de [Orban et al., 2006]

Chapitre 4

Questions

4.1 Par quels mécanismes un courant membranaire comme I_H participe à la génération et à la synchronisation des oscillations θ à travers les réseaux corticaux ?

Nous avons vu d'une part que le courant I_H , à la manière d'un ressort ou d'un amortisseur électrophysiologique, met en forme les caractéristiques de réponse temporelle à des variations infraliminaires du potentiel de membrane. D'autre part les courants intrinsèques participent à l'organisation temporelle de l'activité de réseaux neuronaux, essentiellement à travers la précision temporelle du couplage entre activité synaptique et déclenchement de PA. La synchronisation d'un grand nombre de neurones provoquant des oscillations de potentiel mesurable au niveau macroscopique comme les oscillations θ constitue un des phénomènes d'organisation temporelle de l'activité de réseau les plus étudiées. Le courant I_H par ses propriétés est un des courants intrinsèques majeurs pour la compréhension de cette interaction entre organisation temporelle de l'activité de réseaux neuronaux et courants intrinsèques. Son rôle dans la détermination de la précision [Hardie and Pearce, 2006][Yamada et al., 2005] et de la synchronisation [McCormick and Bal, 1997][Bal and McCormick, 1997] dans plusieurs systèmes est bien établi. Le blocage du courant I_H semble avoir des effets sur la génération et le maintien des oscillations θ [Cobb et al., 2003][Gillies et al., 2002], même si jusqu'à présent il n'existe pas de résultat clair, l'utilisation de ZD7288 à trop forte concentration pouvant être suspectée d'effet annexe sur la transmission synaptique [Chevalayre and Castillo, 2002].

Quel est l'effet du blocage spécifique du courant I_H sur des oscillations θ *in vitro* dans des structures corticales ?

Nous montrons que si le blocage du courant I_H ne fait pas complètement disparaître les oscillations θ , il en perturbe significativement la régularité. Si le courant I_H participe à la génération d'oscillation θ , d'autres mécanismes le rendent non nécessaires. Le courant I_H aurait surtout un effet sur la synchronisation des oscillations, à l'instar de ce qu'indiquent deux travaux récents de simulation [Rotstein et al., 2005][Orban et al., 2006].

Nous avons donc essayé d'analyser comment le courant I_H participe à la synchronisation en affinant la précision de la transmission de l'oscillation θ . Le courant I_H participe à la décharge régulière spontanée dans le spectre de fréquence θ de plusieurs types de neurone, notamment les interneurons GABAergiques localisé entre le stratum oriens et l'alveus (interneurones OA) [Maccaferri and McBain, 1996][Gillies et al., 2002].

Est-ce le courant I_H participe à la régularité de décharge des interneurons OA, suspecté d'être des générateurs locaux du rythme θ dans l'hippocampe ?

Le courant I_H favorise l'intégration de l'activité synaptique dans le domaine de fréquence θ en établissant une résonance dans les cellules pyramidales de CA1 [Hu et al., 2002], dans les cellules pyramidales de la couche 5 du néocortex, particulièrement dans l'arbre dendritique [Ulrich, 2002]. S'il est établi que les interneurons OA présentent une résonance dans le domaine de fréquence θ , on ne sait pas quel(s) courant(s) en est responsable.

Est-ce le courant I_H détermine la résonance des interneurons OA ?

Les oscillations θ dans l'hippocampe dépendent surtout de l'activité inhibitrice GABAergiques [Gillies et al., 2002][Klausberger et al., 2004]. Or la pente de repolarisation consécutive à un PPSI peut synchroniser le déclenchement de PA consécutif [Cobb et al., 1995]. Il n'est pas établi si le courant I_H participe à ce phénomène.

Le courant I_H participe t'il à la précision du déclenchement d'un PA consécutif à un PPSI (couplage I-S) ?

La précision du couplage entre activité synaptique et déclenchement de PA dépend de la forme des PPS. L'activation d'un courant sortant dans un deuxième temps d'un PPSE améliore la précision du couplage E-S [Fricker and Miles, 2000]. Le courant I_H est à même de réaliser cette accélération du décours temporel des PPSE à travers sa désactivation consécutive à une dépolarisation du potentiel de membrane [Magee, 1998].

Le courant I_H participe t'il à la précision du couplage E-S ?

Ainsi nous entendons montrer que le courant I_H participe essentiellement à la synchro-

nisation des oscillations θ :

1. en participant à la génération spontanée de rythme au niveau de cellule isolée, c'est à dire en rendant des cellules "pacemaker" (neurones septo-hippocampaux GABAergiques, interneurons OA...),
2. en définissant des propriétés des résonance dans le domaine de fréquence θ dans chaque cellule impliquée dans l'oscillation de réseau,
3. en favorisant la précision du déclenchement de PA en réponse à une activité inhibitrice synchronisée,
4. et en favorisant la précision du déclenchement de PA en réponse à l'excitation.

4.2 La modulation des propriétés cinétiques du courant I_H peut-elle modifier les caractéristiques des oscillations θ ?

Le courant I_H présente une grande variabilité de propriétés, notamment cinétiques, à travers le systèmes nerveux et au cours du temps. Il peut être modulé par plusieurs voies de signalisation. L'AMPc en particulier module la cinétique du courant I_H . Une augmentation de la concentration en AMPc accélère la cinétique du courant I_H .

La concentration en AMPc augmente au niveau tissulaire dans l'hippocampe après activation des récepteurs NMDA [Chetkovich et al., 1991]. En utilisant un indicateur de la concentration en AMPc intracellulaire basé sur la variation de l'efficacité du transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) [Ponsioen et al., 2004], nous pouvons maintenant suivre sur des cellules en culture la concentration en AMPc intracellulaire simultanément à des enregistrements électrophysiologiques.

L'activité synaptique et/ou les décharges synchrones pendant les oscillations θ dans l'hippocampe changent elles la concentration en AMPc ?

Il a déjà été montré dans plusieurs cas que la modulation de la cinétique du courant I_H a d'important effet fonctionnel. Pendant les oscillations thalamocorticales notamment l'augmentation de la concentration en AMPc provoquée par l'entrée de calcium pendant une longue période de décharge de PA dépolairise le niveau d'activation du courant I_H , ce qui amortit les oscillations [Lüthi et al., 1998][Lüthi and McCormick, 1999].

Les changement de concentration en AMPc dans les cellules hippocampales modulent elles les caractéristiques cinétiques du courant I_H ?

Chapitre 5

Méthodes

Nous avons au cours de cette thèse utilisé plusieurs méthodes expérimentales.

5.1 Électrophysiologie

L'électrophysiologie *in vitro* aura été notre principale démarche expérimentale. Nous avons enregistré les courants électriques transmembranaires de neurones de rat maintenus en culture dans des tranches "fraîches" (*acute slices*) de néocortex et d'hippocampe. Les enregistrements ont été menés en mode courant imposé, ce qui nous a permis de suivre les variations de potentiel de membrane. Il s'agit d'une méthode déjà bien établie. Nous vous renvoyons à la description méthodologique du premier chapitre des résultats [Gastreïn et al., 2007].

Nous avons également enregistré en mode courant imposé des neurones murins d'hippocampe maintenus en culture organotypique pendant plusieurs semaines. L'utilisation de culture organotypique nous a permis de transfecter les cellules afin qu'elles expriment un détecteur de l'AMPc (voir ci-dessous). La méthode de culture organotypique en tube roulant a été mise au point par Gähwiler et collaborateurs [Gähwiler, 1981][Fischer et al., 1999].

5.2 Caractérisation des oscillations

Afin de caractériser des changements d'oscillation plus fine qu'une disparition ou qu'un changement de spectre de fréquence, nous avons analysé les autocorrélogrammes des enregistrements électrophysiologiques. Nous nous sommes inspirés de la procédure

développée par Bringuier et collaborateurs [Bringuier et al., 1997]. Nous mesurons la régularité des intervalles entre les sept premiers optima par le **coefficient d'oscillation** (Fig.5.1-A) et l'amplitude entre le premier minimum et les deux premiers minima, que nous appelons l'**amplitude d'oscillation** (Fig.5.1-A).

Nous considérons que Co évalue la **régularité** et Ao la **synchronisation**.

La détermination des optima des autocorrélogrammes est effectuée à l'aide d'un programme écrit en langage perl.

5.3 Évaluation de la concentration en AMPc intracellulaire

5.3.1 Principes du FRET

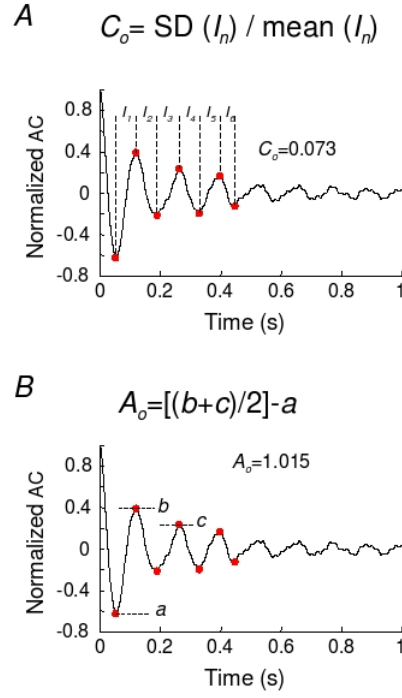
Le transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) se produit entre deux fluorophores quand le spectre d'émission de l'un (le donneur) recouvre le spectre d'excitation de l'autre (l'accepteur). L'efficacité du FRET est inversement proportionnelle à la puissance sixième de la distance entre les deux fluorophores. La distance pour laquelle l'efficacité du FRET est de 50 % s'appelle la distance de Förster [Förster, 1948].

5.3.2 Détecteur de la $[AMPc]_i$

Un détecteur de l'AMPc basée sur Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) utilisant le FRET a été développé par Ponsioen et collaborateurs. La présence d'AMPc provoque des changements conformationnels au niveau de Epac. Epac a été fusionné avec une CFP et une YFP aux extrémités N et C respectivement. En présence d'AMPc, la construction se déplie et l'efficacité du FRET diminue (Fig.7.1). La délétion du domaine de localisation membranaire DEP permet d'obtenir une protéine cytosolique qui interagit moins avec ces cibles originelles (notamment rap1) [Ponsioen et al., 2004].

Mesure du FRET par le rapport d'intensité d'émission

Chaque fluorophore peut être caractérisé par un spectre de longueurs d'onde d'excitation et un spectre de longueurs d'onde d'émission. L'excitation d'un fluorophore par un photon est suivie par l'émission d'un photon de moindre énergie. Nous avons évalué le FRET par le rapport entre l'intensité de l'émission du donneur sur l'intensité de l'émission de



1

Fig. 5.1: Caractérisation d'un autocorrélogramme

A) Le coefficient d'oscillation (C_o) est le rapport entre l'écart type et la moyenne des durées-intervalles entre chaque optimum de l'autocorrélogramme. Plus C_o est petit, plus l'autocorrélogramme traduit une oscillation régulière.

B) L'amplitude d'oscillation (A_o) est la différence entre le premier minimum et la moyenne des deux premiers maxima. Plus A_o est grande, moins l'autocorrélogramme est amorti, ce qui traduit une oscillation très synchrone.

l'accepteur. Nous avons ici suivi l'efficacité de FRET dans des cellules exprimant CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP après transfection en mesurant le rapport entre l'intensité de fluorescence CFP et l'intensité de fluorescence YFP.

Deuxième partie

Resultats

Chapitre 6

Le courant I_H détermine les oscillations corticales via la résonance intrinsèque, la fidélité de décharge et le couplage entre potentiels postsynaptiques et décharge

Marseille passe pour la dernière grande ville populaire de France. Et les mêmes qui, hier, constataient ce fait en se pinçant les narines, semblent aujourd'hui le voir comme quelque chose de fort positif... D'autres plus avisés, disent que Marseille nivelle par le bas. De fait, aussi bien l'élément proprement endogène de la culture locale que les apports des différentes immigrations y semblent comme neutralisés, en vertu d'une cohabitation minimale. Comme si cette ville n'arrivait pas à assumer sa propre richesse humaine. Cela s'explique simplement : on trouvera peu de villes, en Europe occidentale, qui aient subi un tel rejet de la part de leurs élites, et qui soient peuplées à ce point de gens qui ont fait, d'une manière ou d'une autre, l'expérience du mépris. Voilà qui définit l'identité de Marseille plus sûrement que les poncifs et stéréotypes habituels.

Aléssi Dell'Umbria (*Histoire universelle de Marseille*)

Article "*Hyperpolarization-activated cationic current (I_H) locks cortical oscillations via intrinsic resonance, spiking fidelity and synaptic potential-spike coupling*"

de Philippe Gastrein, Émilie Campanac, Norbert Ankri et Dominique Debanne.

Travaux réalisés au sein de l'équipe de Dominique Debanne, "Plasticité de l'excitabilité et épilepsie" INSERM U641 Neurobiologie des Canaux Ioniques ; Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine secteur nord, IFR 11, Marseille, F-13916 France.

Hyperpolarization-activated cationic current (I_h) locks cortical oscillations via intrinsic resonance and enhanced temporal spiking fidelity

Philippe Gastrein^{1,2*}, Émilie Campanac^{1,2*}, Norbert Ankri^{1,2} & Dominique Debanne^{°1,2}

¹INSERM U641, Marseille, F-13916 France

²Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine secteur nord, IFR 11, Marseille, F-13916 France

**Equal contribution to the work*

[°]To whom correspondence should be addressed,

Tel: (+33) 4 91 69 87 45

Fax: (+ 33) 4 91 09 05 06

E-mail: debanne.d@jean-roche.univ-mrs.fr

6 figures, 1 supplementary figure
27 pages

Hyperpolarization-activated nucleotide cyclic-modulated current (I_h) is present in a wide range of cortical neurons such as pyramidal cells and inhibitory interneurons. In pyramidal neurons I_h sets their resonance frequency within the θ -range (5-12 Hz). However, its contribution in the temporal organization of neuronal activity remains unclear. We examined here the role of I_h in carbachol-induced θ -like oscillations in the visual neocortex and the hippocampus *in vitro*. We show that pharmacological blockade of I_h with external cesium or ZD-7288 reduced the coherence of θ oscillations. Next, we determined the role of I_h in 4 important neuronal operations occurring during network activity at θ frequency. We show here that blockade of I_h 1) reduced the intrinsic resonance at θ frequencies in GABAergic interneurons, 2) decreased the regularity of firing in interneurons because of a reduced rate of AHP repolarization, 3) decreased the precision of the EPSP-spike and 4) IPSP-spike coupling in pyramidal neurons. EPSP-spike coupling was temporally precise because I_h reduced EPSP duration whereas IPSP-spike coupling was reliable because I_h accelerated the rate of membrane repolarization after each IPSP. We conclude that I_h promotes the regularity of θ oscillation by acting on intrinsic resonance, spiking fidelity and precision of synaptic potential-spike coupling.

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN or h) channels are widely expressed in cortical neurons including pyramidal cells (Maccaferri *et al.*, 1993; Magee, 1998) and GABAergic interneurons (Maccaferri & McBain, 1996; Râteau & Ropert, 2006; Aponte *et al.*, 2006). Their biophysical properties and subcellular localization in the dendrites (Magee, 1998; Lörincz *et al.*, 2001) and the axon (Aponte *et al.*, 2006) makes them privileged actors in the control of information processing in the brain. H-channels sharpen EPSPs (Magee, 1998) and IPSPs (van Brederode & Spain, 1995) as a result of I_h deactivation and activation, respectively.

Although the contribution of h-channels in pacemaker activity has been demonstrated in cardiac and thalamic cells (review in Robinson & Siegelbaum 2003), the precise role of h-channels in determining the temporal organization of network activity remains poorly understood. Theoretical studies suggest that h-channels may control θ rhythmic activity in hippocampal networks (Rotstein *et al.*, 2005; Orban *et al.*, 2006) but the experimental demonstration of the importance of h-channels in hippocampal rhythms remains unclear and controversial (Magee, 2001; Kitayama *et al.*, 2002; Nolan *et al.*, 2004). For instance, pharmacological blockade of h-channels with 100 μ M ZD-7288 disorganizes θ activity *in vitro* (Cobb *et al.*, 2003). But it was not clear in this study whether the loss of oscillation was not simply due to a non specific effect of ZD-7288 on synaptic transmission (Chevalleyre & Castillo, 2002). In the developing hippocampus, giant-depolarizing potentials (GDPs) are disrupted by ZD-7288 (Bender *et al.*, 2005). However, in the cortex, h-channel blockers do not affect the frequency of cortical oscillations produced by partial disinhibition (Castro-Alamancos *et al.*, 2007). In addition, the precise contribution of h-channel in the integration of excitatory and inhibitory synaptic potentials remains largely puzzling. The role of h-channels in the resonance of the membrane potential at θ -like frequency (range 3-12 Hz) has been demonstrated in CA1 (Hu *et al.*, 2002) and L5 (Ulrich, 2002) pyramidal cells, but one still ignore whether I_h also sets the θ resonance in GABAergic

interneurons, a cell type that plays a critical role in θ oscillations (Maccaferri & McBain, 1996; Chapman & Lacaille 1998; Pike *et al.*, 2000). Finally, the precise role of I_h in the functional coupling between synaptic potentials and action potentials remains unknown.

We examined here the role of I_h in carbachol-induced θ -like oscillations in the hippocampus and visual neocortex *in vitro*. We show that pharmacological blockade of I_h with external cesium or ZD-7288 reduced the coherence of θ oscillations. The role of I_h was determined in 4 important neuronal operations that are likely to occur during network activity at θ frequency. We show here that pharmacological blockade of I_h 1) reduced the regularity of firing in GABAergic interneurons as a result of the decrease of the AHP repolarization rate, 2) reduced the intrinsic resonance at θ frequencies in pyramidal cells and interneurons, 3) decreased the precision of the EPSP-spike and 4) IPSP-spike coupling in pyramidal neurons. Our results indicate that EPSP-spike coupling was temporally precise because I_h reduced EPSP duration whereas IPSP-spike coupling was reliable because I_h accelerated the rate of membrane repolarization after each IPSP. We conclude that I_h promotes the regularity of θ oscillations by acting on intrinsic resonance, spiking fidelity and precision of synapse-spike coupling.

METHODS

Slice preparation and electrophysiology

The methods used to prepare hippocampal and cortical slices have been detailed previously (Daoudal *et al.* 2002, Sourdet *et al.* 2003). Cortical and hippocampal slices (350-400 μm) were obtained from 15- to 20-day-old rats. All experiments were carried out according to the European and Institutional guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 86/609/EEC and French National Research Council). Briefly, rats were deeply anaesthetized with chloral hydrate (intraperitoneal, 200 mg kg^{-1}) and killed by decapitation. Slices were cut in a solution containing: (in mM) sucrose, 280; NaHCO_3 , 26; D-glucose, 10; KCl, 1.3; CaCl_2 , 1; MgCl_2 , 10, and were bubbled with 95% O_2 - 5% CO_2 , pH 7.4. The slices were maintained for one hour at room temperature in oxygenated (95% O_2 /5% CO_2) artificial cerebrospinal fluid (ACSF; in mM: NaCl, 125; KCl, 2.5; NaH_2PO_4 , 0.8; NaHCO_3 , 26; CaCl_2 , 3; MgCl_2 , 2; D-Glucose, 10). Each slice was transferred to a temperature-controlled (34°C) recording chamber with oxygenated ACSF. Neurons were visualized in DIC infrared (IR)-videomicroscopy for patch experiments. For whole-cell recordings from cortical L5 and CA1 pyramidal neuron, the electrodes were filled with an internal solution containing (in mM): K-gluconate 120; KCl 20; HEPES 10; EGTA 0.5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2; Na_2ATP 2.

EPSP-spike coupling was investigated in CA1 pyramidal cells in the presence of the GABA_A receptor blocker picrotoxin (PiTX, 100 μM). In these conditions, the CA3 area was surgically isolated from the CA1 area in order to avoid spontaneous burst discharge. IPSP-spike coupling was investigated in the presence of kynurenate (2 mM) in order to evoke monosynaptic IPSPs with electrical stimulation in the cell-body layer. To record hyperpolarizing GABA_A receptor mediated PSPs the intrapipette chloride concentration was reduced to 2 mM (K-MeS 150 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0.5 mM, MgCl_2 2 mM, Na_2ATP 2 mM, NaGTP 0.3 mM, 10 mM

phosphocreatine).

Field-potentials were recorded in the *stratum pyramidale* using glass microelectrodes filled with 3M NaCl. Glass stimulating electrodes filled with extracellular saline were placed in the *stratum radiatum*.

Drugs were bath applied. PiTX, kynurenate and bicuculline methiodide were purchased from Sigma and ZD-7288 from Tocris-Cookson. In order to avoid non specific presynaptic effect, ZD-7288 was applied at 1 μ M (Chevalleyre & Castillo, 2002). With this concentration, no reduction in synaptic strength was observed. All recordings were made at 34°C (except for experiments in neocortical slices, 38°C).

Data acquisition and analysis

Electrophysiological recordings were obtained using an Axoclamp 2B or an Axopatch 200B amplifier, Acquis1 software (Bio-Logic, Orsay, France) or pClamp (Axon Instruments) version 8 or 9. Data were analysed with IGOR version 5.03 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) or a home-made software (PERL, written in Linux). Pooled data are presented as mean \pm SE and statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test.

Auto- and cross-correlation functions were calculated from the membrane potential recordings with a PERL programmed script and then normalized. To quantify the coherence and amplitude of the oscillation, we used the method described in Bringuier and coworkers (1997). Briefly, voltage recordings were filtered to remove signals faster than 10 mV/ms. Autocorrelation function was computed and optima in the autocorrelogram were detected with a PERL routine (red dots in **Supplementary Fig.1A**). An evaluation of the period of oscillation is given by the intervals between maxima and minima (I_1 to I_6 , **Supplementary Fig. 1A**). The coefficient of oscillation (C_o) was determined as the ratio of standard deviation over the mean to quantify the temporal coherence of the oscillation. The amplitude of oscillation (A_o) was determined by the

amplitude between the first minimum and the average of the first two maxima (**Supplementary Fig. 1B**).

Recording and analysis of electrical resonance

The impedance amplitude profile (ZAP) method was used to characterize the electrical resonance of interneurons (Pape & Driesang, 1998; Hutcheon & Yarom, 2000; Hu *et al.*, 2002). Briefly, a sinusoidal current with constant amplitude and linearly increasing frequency (0-10 Hz for 30 sec) was injected in the recorded electrode and the voltage response was recorded. Resonance was signaled by a distinct peak in the voltage response. The cell impedance as a function of frequency was given by the ratio of the fast-Fourier transform (FFT) of the voltage response to the magnitude of the FFT of the input current.

RESULTS

Blockade of I_h disturbs cortical θ oscillations

In the visual cortex. Spontaneous or evoked θ cortical oscillations (3-12 Hz) were induced by activation of muscarinic receptors with carbachol (100 μ M) in slices of rat visual cortex disinhibited with the GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μ M) (Lukatch & McIver, 1997). Spontaneous θ episodes of 3-10 s (mean: 5.9 ± 2.6 s, $n = 7$ slices) recorded in field potential in layers 4/5 appeared within 5-20 minutes of carbachol application. Typically, they began with a large negative shift followed by a θ episode, sometimes also followed by series of regular burst. The frequency of spontaneous θ episodes was 9.2 ± 2.0 Hz ($n = 7$ slices). Simultaneous field potential and whole-cell recordings from an adjacent L5 pyramidal neuron showed that field oscillations were correlated with sub- and suprathreshold θ activity (**Fig.1A**, left). In contrast with a previous report (Cobb *et al.*, 2003), network activity was not totally abolished in the presence of 1 μ M ZD-7288. Rather, blockade of I_h with ZD-7288 (1 μ M) increased the duration of the spontaneous θ episodes (5.9 ± 2.6 s in control and 7.2 ± 3 s, $n = 7$ in the presence of ZD-7288, $p < 0.05$ Mann-Whitney test), suggesting that at this concentration, ZD-7288 does not block synaptic transmission (Chevalleyre & Castillo, 2002) and did not produce a functionally important hyperpolarization of the membrane potential (Gasparini & Di Francesco, 1997). But most importantly h -channel blockers disorganized the temporal coherence of spontaneous θ oscillations (**Fig.1A**). Similar changes were observed when θ oscillations were evoked by electrical stimulation of the layer II-III (**Fig. 1B**). Therefore, data from spontaneous and evoked θ oscillations were pooled together. The temporal coherence of the oscillation was decreased in the presence of ZD-7288 (the coefficient of oscillation C_o increased from 0.081 ± 0.01 in control to 0.140 ± 0.02 in the presence of ZD-7288, Mann-Whitney test, $p < 0.1$) and the amplitude of the oscillation was decreased (the amplitude of oscillation A_o dropped from 0.902 ± 0.047 in control to 0.722 ± 0.064 , $n = 5$ in the presence of ZD-7288, $p < 0.05$; **Fig. 1C**). The oscillation frequency

remained, however, stable in the presence of h-channel blocker (9.8 ± 1.9 Hz in control vs. 9.3 ± 1.6 Hz, $n = 5$, Mann-Whitney test $p > 0.1$). In conclusion, h-channels participate to the temporal organization of network activity in the θ -frequency range.

In the hippocampus. We next examined whether h-channels also organize rhythmic activity in the hippocampus *in vitro*. Network activity was measured in the area CA3 with an extracellular electrode whereas intracellular activity was monitored in a CA1 pyramidal neuron. As previously reported (Konopacki *et al.*, 1987; Cobb *et al.*, 2003), 50 μ M carbachol depolarized the neuron, increased spontaneous synaptic activity and systematically induced robust and non decrementing θ oscillations ($C_o < 0.01$; $A_o > 1.5$) in the CA1 pyramidal neuron and in the CA3 field potential ($n = 6$ out of 6 slices tested, **Fig. 2A**). In contrast, in the presence of ZD-7288 (1 μ M), carbachol either failed to induce θ oscillations in parent hippocampal slices or produced in the best cases decrementing and irregular oscillations ($C_o > 0.01$ and $A_o < 1.5$), $n = 6$ slices; **Fig. 2B**). Thus, h-channels also set the coherence of hippocampal θ oscillations.

Compared to the neocortex, synaptic circuits are relatively simple in the hippocampus and consensual mechanisms that convey θ hippocampal oscillations *in vitro* have been proposed (Buzsaki, 2002). Carbachol increases activity in interneurons and pyramidal neurons, and schematically θ rhythm is thought to result from 1) *resonance* of subthreshold excitatory and inhibitory potentials (Hu & Storm 2002; Ulrich, 2002) 2) *pacemaker* activity of hippocampal GABAergic interneurons (Gillies *et al.*, 2002; Rotstein *et al.*, 2005), 3) *synchronization* of pyramidal cell spiking by IPSPs (Cobb *et al.*, 1995; Reich *et al.* 2005), and 4) *patterning* of EPSP-induced spiking activity. In the rest of this study, we examined how h-channels control these 4 elementary neuronal operations.

H-channels control the resonance frequency in oriens interneurons

H-channels set the resonance frequency in hippocampal (Hu *et al.*, 2002) and cortical pyramidal neurons (Ulrich, 2002) but it is not clear whether they control intrinsic membrane resonance in inhibitory interneurons (Pike *et al.*, 2000). H-current is particularly prominent in interneurons from the *stratum oriens* (Maccaferri & McBain, 1996; Lupica *et al.*, 2001). A subpopulation of these cells is particularly sensitive to muscarinic receptor stimulation (Lawrence *et al.*, 2006). We therefore examined whether h-channel activity determines the resonance frequency of the membrane potential in these interneurons. Eight interneurons with a horizontal fusiform cell body were recorded in the *stratum oriens* (**Fig. 3A**). Consistent with the behavior of *oriens* interneurons (Maccaferri & McBain, 1996), their action potentials were fast and displayed a deep after-hyperpolarization (AHP). In addition, a large depolarizing sag (arrow **Fig. 3A**) was elicited in response to the injection of hyperpolarizing pulses of current. We first studied the impact of the membrane potential on the resonance behavior of interneurons. The membrane potential was clamped manually at a potential ranging from -55 to -75 mV with the injection of a constant current. A sinusoidal (ZAP) current with constant amplitude but linearly increasing frequency was injected through the recording electrode (0-10 Hz during 30 s; **Fig. 3B**). In all cases, the amplitude of the oscillating current was adjusted to keep the voltage response below the action potential threshold. The resonance frequency was faster for hyperpolarized membrane potential (1.8 ± 0.3 Hz at -75 mV vs. 1.0 ± 0.0 Hz at -55 mV, $n = 8$; **Fig. 3B**). In contrast with the U-shape voltage-dependent resonance reported in CA1 pyramidal cells (Hu *et al.*, 2002), the dependence was linear in *oriens* interneurons (linear fit, $R^2=0.88$). Most importantly, the resonance behavior of *oriens* interneurons was totally suppressed after pharmacological blockade of h-channel with external Cs^+ (2 mM, **Fig. 3C** and **3D**). In the presence of external Cs^+ , the impedance profile resembled that of a purely passive membrane (Huchon & Yarom, 2000). This behavior was

observed in all the interneurons tested ($n = 8$). Thus, h-channels set the resonance frequency near 1-2 Hz in interneurons from the *stratum oriens*.

Pacemaker activity in GABAergic interneuron is controlled by h-channels

In the cortex, activity of pyramidal neurons is synchronized by inhibitory interneurons (Cobb *et al.*, 1995). GABAergic interneurons from the *stratum oriens* inhibit the dendrite of CA1 pyramidal neurons. They are depolarized by cholinergic receptors and spontaneously fire at a frequency in the θ range. Although I_h contributes to *oriens* interneuron pacemaking activity by shaping AHPs (Maccaferri & McBain, 1996), the role of h-channels in determining the temporal regularity of the firing remains unclear. We re-examined this question in *stratum oriens* interneurons from the CA1 region. Interneurons were recorded in the presence of kynurenate and picrotoxin to block fast synaptic transmission. Upon depolarization by injection of constant positive current, these neurons fired regularly ($CV = 0.11 \pm 0.03$, $n = 6$) at a frequency close to the low θ -range (3.1 ± 0.5 Hz, $n = 6$; **Fig. 4A, 4B**). In the presence of external Cs^+ , the mean frequency decreased to 1.3 ± 0.2 Hz ($n = 6$), as previously observed (Maccaferri & McBain, 1996). Most importantly, the regularity of the firing was markedly reduced ($CV = 0.31 \pm 0.07$, $n = 6$, **Fig. 4A, 4B**). We next determined the origin of this decreased regularity of pacemaker firing. It has been established that fast rates of membrane depolarization favor temporally precise spiking (Sourd et al., 2003). In agreement with this idea, the rate of membrane repolarization during the decay of the AHP was found to be significantly reduced when h-channels were blocked pharmacologically (0.20 ± 0.02 mV/ms in control vs. 0.15 ± 0.01 mV/ms in Cs^+ , $n = 6$, $p < 0.01$). In conclusion, the regularity of the pacemaker activity in *oriens* interneurons is disorganized when h-channels are blocked through a reduction in the rate of the AHP decay.

H-channels enhance the precision of IPSP-spike coupling in CA1 pyramidal neurons

Basket cells synchronize pyramidal cell firing through rebound excitation produced by IPSPs (Cobb *et al.*, 1995; Somogyi & Klausberger, 2005). In fact, IPSP-spike sequences were occasionally observed during CCh-induced θ oscillations (**Fig. 5A**). Synchronization between neurons receiving a common inhibitory input might be improved by h-channels because they accelerate the rate of membrane depolarization during the IPSP. We therefore examined whether the precision of IPSP-spike coupling was affected by h-channel blockers. CA1 pyramidal neurons were whole-cell recorded with a pipette solution containing a low concentration of chloride ions and monosynaptic IPSPs were evoked in the presence of 2 mM kynurenatate with a stimulating electrode located in the pyramidal cell layer to preferentially activate basket cells. The pyramidal neuron was held near -50 mV by injection of constant depolarizing current (range +10 / +30 pA) to produce spontaneous spike firing. As previously reported, rebound spikes were evoked by the IPSP in a narrow time-window (**Fig. 5B**). Bath application of external cesium (2.5 mM) totally disorganized rebound spiking. Fitting histograms of the first spikes with Gaussians revealed that the dispersion was significantly higher in the presence of Cs^+ (in control, $\sigma = 102 \pm 14$ ms; in the presence of Cs^+ $\sigma = 198 \pm 45$ ms, $n = 7$; Wilcoxon $p < 0.05$). Here again, the loss of temporal precision could be attributed to a change in the rate of membrane depolarization before spike generation (Sourdret *et al.*, 2003). In fact, the IPSP decay slope was found to be reduced in the presence of cesium (0.030 ± 0.004 mV/s in control vs. 0.024 ± 0.004 mV/s in the presence of cesium, $n=7$, **Fig. 5C**). Thus, our results indicate that the shaping of the IPSP by h-channels allows temporally precise rebound firing through an acceleration of the rate of membrane depolarization before spike generation.

H-channels determine the temporal precision of EPSP-spike coupling

During θ -cycles, sub-threshold excitatory potentials occasionally evoke APs in pyramidal

neurons (**Fig. 6A**, Cobb *et al.*, 2003). We therefore determined the contribution of h-channels in the temporal precision of the EPSP-spike coupling. The depolarization elicited by an EPSP deactivates h-channels and produces a fictive outward current that accelerates the rate of repolarization after the peak of the EPSP. Importantly, synaptic or intrinsic outward currents that sharpen EPSP waveform improve temporal precision of EPSP-spike coupling by reducing the duration of the EPSP (Fricker & Miles, 2000; Pouille & Scanziani, 2001; Axmacher & Miles, 2004). We therefore tested the effects of h-channel blockers on the EPSP-spike coupling in CA1 pyramidal neurons. In these experiments, the stimulus intensity was adjusted to produce a spike in about half of the trials and the shift in membrane potential induced by the h-channel blocker was compensated with constant holding current. In the presence of external Cs^+ (2.5 mM; **Fig. 6B**) or ZD-7288 (1 μM ; **Fig. 6C**), the latency of the AP evoked by the EPSP was found to be more variable from trial to trial compared to control (SD in control: 5.3 ± 0.5 ms; SD in the presence of h-channel blocker: 18.0 ± 3.9 ms, $n=15$, Wilcoxon test, $p<0.01$, **Fig. 6D**). The EPSP-spike precision was enhanced because the duration of subthreshold EPSP at nearly maximal depolarized potential was enhanced in the presence of h-channel blockers. In fact, the duration of the EPSP at 90% of its amplitude was significantly longer in the presence of h-channel blocker compared to the control (in control: 24 ± 1 ms, in the presence of h-channel blockers: 48 ± 4 ms; **Fig. 6E**). Interestingly, the normalized changes in EPSP duration at 90% and the normalized change in the SD induced by h-channel blockers were positively correlated ($R^2=0.84$, **Fig. 6F**), indicating that EPSP-spike precision tightly depends on the duration of the EPSP at the peak. In conclusion, h-channels improve the temporal precision of the EPSP-spike coupling because h-channels accelerate the decay of EPSPs and thus reduce the time during which an AP can be triggered by the EPSP.

DISCUSSION

We show here that h-channels set the regularity of 3-15 Hz network oscillation in the visual cortex and the hippocampus *in vitro*. To further understand the underlying mechanisms we focused our study on the role of I_h in the temporal organization of neuronal activity within the CA1 hippocampal circuitry. The blockade of I_h abolished intrinsic membrane resonance and decreased the regularity of pacemaker firing in interneurons from CA1 *stratum oriens*. Furthermore, I_h sets the temporal precision of IPSP-spike and EPSP-spike coupling in CA1 pyramidal neurons.

H-channels and neocortical and hippocampal θ oscillations

I_h is widely acknowledged as a major determinant of 4-10 Hz subthreshold and suprathreshold oscillations in thalamic circuits (Bal & McCormick, 1996; Lüthi & McCormick, 1998) and in the olive inferior (Bal & McCormick, 1997). In these subcortical circuits, h-current promotes the generation of low-threshold (T-type) calcium spikes on the top of which sodium action potentials can be elicited. Our study indicates that the role of h-current in determining network oscillation can be extended to cortical circuits.

Pharmacological blockade of I_h with 1 μ M ZD-7288 did not totally suppress carbachol-induced θ oscillations in both neocortical and hippocampal slices but rather disturbed their regularity and their amplitude. In fact, auto- and cross-correlation functions of neocortical or hippocampal CA3 field potential as well as intracellular voltage signals from L5 or CA1 pyramidal neurons displayed dampened and imprecise oscillations in the presence of h-channel blockers. The effects of ZD-7288 could be followed in the same recordings in the neocortex because spontaneous or evoked θ episodes were consistently observed. In contrast, θ oscillations in hippocampal slices were consistently induced in the first 2-5 minutes of carbachol application (6

out 6 slices) but were much less frequent after 10 minutes of application. Despite this fact, the comparison of θ oscillations induced in parent slices during the same experiments showed that oscillations measured in both CA3 (field potential) and CA1 (whole-cell) were less reproducible in the presence of ZD-7288.

We report here that the frequency of cortical oscillation was not affected by ZD-7288. Our findings are in total agreement with previous observations indicating that the power-spectrum of ~ 10 Hz cortical oscillations induced by disinhibition was not affected by external Cs^+ or ZD-7288 (Castro-Alamancos *et al.*, 2007). In this study however, the regularity of the oscillation was not analyzed. We clearly show here that both the amplitude and the regularity of the neocortical oscillation quantified by the auto-correlation function were decreased in the presence of ZD-7288.

The disorganization of cortical activity cannot be attributed to a non-specific effect of ZD-7288 such as post-synaptic hyperpolarization or blockade of synaptic transmission. At the concentration used in the experiments (1 μM) synaptic transmission is virtually unaffected (Chevalleyre & Castillo, 2003; see also Fig. 5 and Fig. 6). Furthermore, in contrast with a previous study (Cobb *et al.*, 2003) network and synaptic activity was not abolished in the presence of h-channel blocker (see Fig. 1 and Fig. 2). In fact, the duration of θ episodes recorded in the neocortex was increased in the presence of ZD-7288, indicating that post-synaptic hyperpolarization plays here a minor role if any.

H-channels and intrinsic resonance

It is well established that h-channels significantly contribute to intrinsic membrane resonance at 3-8 Hz in both L5 and CA1 pyramidal neurons (Ulrich, 2002; Hu *et al.*, 2002). H-current is also present in a wide range of GABAergic hippocampal interneurons (Maccaferri & McBain, 1996; Lupica *et al.*, 2001; Aponte *et al.*, 2006). We focused our study on *stratum oriens* interneurons

because their prominent h-current (Maccaferri & McBain, 1996; Lupica *et al.*, 2001) and their sensitivity to muscarinic receptor stimulation (Lawrence *et al.*, 2006) make them putative candidates in the patterning of carbachol-dependent θ oscillations. We show that *stratum oriens* interneurons display a resonance frequency that linearly depends on membrane potential. The resonance frequency was found to be faster at -75 mV than at -55 mV. Importantly, we show that h-channels play a critical role in the resonance of *stratum oriens* interneurons. In the presence of external Cs^+ , the resonance was totally abolished and the impedance profile resembled that of a purely passive membrane (Hucheson & Yarom, 2000). Thus, h-channels not only determine the resonance frequency in the lower θ -frequency range in L5 and CA1 pyramidal neurons but also in GABAergic interneurons of the stratum oriens. Other CA1 hippocampal interneurons might express h-current-dependent intrinsic resonance. Half of CA1 hippocampal interneurons located in the *strata pyramidale* and *radiatum* display I_h (Parra *et al.*, 1998). CA1 interneurons of stratum *lacunosum-moleculare* display h-current (Chapman & Lacaille, 1999). In addition, basket cells in the dentate gyrus exhibit a small h-current (Aponte *et al.*, 2006). Moreover, axons or cell body of putative PV positive basket-cells are immunopositive for HCN1, HCN2 and HCN4 (Brewster *et al.*, 2007). In the neocortex, Martinotti cells that are involved in recurrent inhibition of L5 pyramidal neurons (Silberberg & Markram, 2007) express HCN4, HCN3 and HCN2 subunits (Wang *et al.*, 2004). Therefore, we can speculate that the findings we report here for oriens interneurons could well apply to neocortical interneurons as well.

I_h controls pacemaker activity in oriens interneurons

Oriens interneurons occupy a key position in the hippocampal circuitry. We show here that blocking h-channels disturbed pacemaker activity in oriens interneurons. Similar findings had been reported previously (Maccaferri & McBain 1996; Gillies *et al.*, 2002). However, in these studies the mechanism responsible for the decreased regularity of the firing was not elucidated.

We show here that the rate of AHP repolarization is significantly reduced in the presence of external Cs^+ . Then, I_h not only accelerates the repolarization of GABA_A -receptor mediated IPSPs in pyramidal neurons but also fastens the decay of AHPs in *oriens* interneurons. Fast rates of depolarization before spike generation represent a favorable condition for temporally precise firing (Sourdet *et al.*, 2003), probably by reducing the temporal window during which voltage-gated channel noise interferes with spike generation.

I_h sets temporal precision of IPSP-Spike coupling

Basket cells synchronize pyramidal cell firing through IPSP-mediated rebound spike firing (Cobb *et al.*, 1995). IPSP-spike coupling is a complex operation that involves the interplay between synaptic and voltage-gated conductances. In fact, at depolarizing potential IPSPs are amplified by the sodium persistent sodium current (I_{NaP} , Stuart, 1999). In addition, I_h determines the precision of IPSP-spike coupling. We show that the temporal dispersion of rebound spikes evoked by monosynaptic IPSPs at a potential of -50 mV was enhanced in the presence of external Cs^+ . The loss of temporal precision could be attributed here again to a reduction in the rate of membrane depolarization before spike generation (Sourdet *et al.*, 2003). Thus, we believe that h-channel-dependent shaping of IPSPs will enhance synchronization of pyramidal cells.

Although I_h is generally considered as a functional break in terms of intrinsic excitability, our results strongly suggest that excess of I_h will promote network synchronization through post-inhibitory rebound firing. In fact, the up-regulation of I_h observed following hyperthermia-induced seizures could participate to maintenance of epileptiform activity via this process (Chen *et al.*, 2001).

The role of I_h on IPSP-spike coupling is probably not limited to the synaptic articulation between basket cells and pyramidal neurons but could well apply to the inhibition of *oriens* interneurons. Indeed, these neurons display a large h-current (Maccaferri & McBain, 1996) and

modeling studies suggests that rebound spiking in *oriens* interneurons represents a critical step in the synchronization of CA1 interneurons (Rotstein *et al.*, 2005). Similarly, our results could also well apply to L5 pyramidal neurons in the neocortex or to CA3 pyramidal cells. Further investigations will be necessary to directly test the role of I_h in IPSP-spike coupling in *oriens* interneurons, L5 and CA3 pyramidal neurons.

I_h sets the temporal precision of EPSP-Spike coupling

Temporal precision of EPSP-spike coupling is controlled by synaptic (Fricker & Miles, 2000; Pouille & Scanziani, 2001) and intrinsic (Fricker & Miles, 2000; Axmacher & Miles, 2004) conductances. In principle, outward currents that follow the EPSP reduce its duration near its maximum and allow generation of a postsynaptic action potential only in a restricted time-window. I_h follows this general rule since its deactivation by an EPSP produces a fictive outward current. In fact, we show that the duration of the EPSP at 90% of its maximal amplitude was significantly prolonged in the presence of h-channel blocker. Interestingly, the effects of h-channel blocker on the EPSP duration and the precision were correlated, indicating that EPSP-spike precision depends on the shape of the EPSP at its maximum. Our study therefore confirms the definition of a simple rule governing the precision of EPSP-spike coupling where precision is improved when the sequence spike-outward current is observed (Fricker & Miles, 2000; Pouille & Scanziani, 2001).

The results we obtained in CA1 pyramidal cells could well apply to any type of post-synaptic cell that express h-current and receive glutamatergic inputs. In fact, we believe that similar conclusion will be drawn for *oriens* interneurons, CA3 or L5 pyramidal cells. Further investigations will be necessary to specifically test the role of I_h in EPSP-spike precision in these neurons.

In conclusion, our study demonstrates that in addition to its well established role on membrane resonance, I_h defines the precision of spike timing during pacemaker firing in interneurons but also at excitatory and inhibitory synapses in CA1 pyramidal cells. We hypothesize that, by this way, h-channels contribute to lock slow frequency oscillations in the theta range both in neocortical and hippocampal circuits.

REFERENCES

- Aponte Y, Lien C-C, Reisinger E & Jonas P (2006) Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *J Physiol* **574**, 229–243.
- Axmacher N & Miles R (2004) Intrinsic cellular currents and the temporal precision of EPSP-action potential coupling in CA1 pyramidal cells. *J Physiol* **555**, 713–725.
- Bal T & McCormick DA (1996) What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* **17**, 297–308.
- Bal T & McCormick DA (1997) Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I_h . *J Neurophysiol* **77**, 3145–3156.
- Bender RA, Galindo R, Mameli M, Gonzalez-Vega R, Valenzuela CF & Baram TZ (2005) Synchronized network activity in developing rat hippocampus involves regional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel function. *Eur J Neurosci* **22**, 2669–2674.
- van Brederode JF & Spain WJ (1995) Difference in inhibitory synaptic input between layer II-III and layer V neurons of the cat neocortex. *J Neurophysiol* **74**, 1149–1166.
- Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M & Baram TZ (2002) Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* **22**, 4591–4599.
- Brewster AL, Chen Y, Bender RA, Yeh A, Shigemoto & Baram TZ (2007) Quantitative analysis of subcellular distribution of mRNA and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cereb Cortex* **17**, 702–712.

- Bringuier V, Frégnac Y, Baranyi A, Debanne D & Shulz DE (1997). Synaptic origin and stimulus dependency of neuronal oscillatory activity in the primary visual cortex of the cat. *J Physiol* **500**, 751–774.
- Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**, 325–340.
- Castro-Alamancos MA, Rigas P & Tawara-Hirata Y (2007) Resonance (approximately 10 Hz) of excitatory networks in motor cortex: effects of voltage-dependent ion channel blockers. *J Physiol* **578**, 173–191.
- Chapman CA & Lacaille JC (1999) Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons of stratum lacunosum-moleculare. *J Neurophysiol* **81**, 1296–1307.
- Chen S, Wang J & Siegelbaum SA (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* **117**, 491–504.
- Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ & Soltesz I (2001) Persistent modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med* **7**, 331–337.
- Chevalleyre V & Castillo (2003) Assessing the role of I_h channels in synaptic transmission and mossy fiber LTP. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 9538–9543.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O & Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* **378**, 75–78.
- Cobb SR, Larkman PM, Bulters DO, Oliver L, Gill CH & Davis CH (2003) Activation of I_h is necessary for patterning of mGluR and mAChR induced network activity in the hippocampal CA3 region. *Neuropharmacology* **44**, 293–303.
- Daoudal G, Hanada Y & Debanne D (2002) Bidirectional plasticity of excitatory postsynaptic

- (EPSP)-spike coupling in CA1 hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 14512-14517.
- Fischer Y, Gähwiler BH & Thompson SM (1999) Activation of intrinsic hippocampal theta oscillations by acetylcholine in rat septo-hippocampal cocultures. *J Physiol* **519**, 405–413.
- Gasparini S & DiFrancesco D (1997) Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocked by ZD-7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflügers Arch* **435**, 99-106.
- Gillies MJ, Traub RD, Le Beau FE, Davies CH, Gloveli T, Buhl EH & Whittington MA (2002) A model of atropine-resistant theta oscillations in rat hippocampal area CA1. *J Physiol* **543**, 779–793.
- Hu H, Vervaeke K & Storm JF (2002) Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by m-current, h-current and persistent Na^+ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **545**, 783–805.
- Hutcheon B & Yarom Y (2000) Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* **23**, 216-222.
- Kitayama M, Taguchi T, Miyata H, Matsuda Y, Yamauchi T & Kogure S (2002) The extracellular current blocking effect of cesium chloride on the theta wave in the rabbit hippocampal CA1 region. *Neurosci Lett* **334**, 45-48.
- Konopacki J, MacIver MB, Bland BH & Roth SH (1987) Carbachol-induced EEG 'θ' activity in hippocampal brain slices. *Brain Res* **405**, 196–198.
- Lörincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R & Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* **5**, 1185-1193.

- Lukatch HS & MacIver MB (1997) Physiology, pharmacology, and topography of cholinergic neocortical oscillations in vitro. *J Neurophysiol* **77**, 2427–2445.
- Lüthi A & McCormick DA (1998) H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* **21**, 9-12.
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A & Di Francesco D (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* **69**, 2129-2136.
- Maccaferri G & McBain CJ (1996) The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol* **497**, 119–130.
- Magee JC (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **18**, 7613–7624.
- Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsaki G, Siegelbaum SA, Kandel ER & Morozov A (2004) A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* **119**, 719-732.
- Notomi T & Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of I_h channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* **471**, 241–276.
- Parra P, Gulyas AI & Miles R (1998) How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* **20**, 983-993.
- Pike F, Goddard RS, Suckling JM, Ganter P, Kasthuri N & Paulsen O (2000) Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents. *J Physiol* **529**, 205-213.

- Rateau Y & Ropert N (2006) Expression of a functional hyperpolarization-activated current (I_h) in the mouse nucleus reticularis thalami. *J Neurophysiol* **95**, 3073-3085.
- Reich CG, Karson MA, Karnup SV, Jones LM & Alger BE (2005) Regulation of IPSP θ rhythm by muscarinic receptors and endocannabinoids in hippocampus. *J Neurophysiol* **94**, 4290–4299.
- Robinson RB & Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* **65**, 453-480.
- Rotstein HG, Pervouchine DD, Acker CD, Gillies MJJ, White JA, Buhl EH, Whittington MA & Kopell N (2005) Slow and fast inhibition and an h-current interact to create a θ rhythm in a model of CA1 interneuron network. *J Neurophysiol* **94**, 1509-1518.
- Silberberg G & Markram H (2007) Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells is mediated by Martinotti cells. *Neuron* **53**, 735-746.
- Somogyi P & Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurones structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* **562**, 9-26.
- Sourdet V, Russier M, Daoudal G, Ankri N & Debanne D (2003) Long-term enhancement of neuronal excitability and temporal fidelity mediated by metabotropic glutamate receptor subtype 5. *J Neurosci* **23**, 10238-10248.
- Surges R, Brewster AL, Bender RA, Beck H, Feuerstein TJ & Baram TZ (2006) Regulated expression of HCN channels and cAMP levels shape the properties of the h current in developing rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **24**, 94–104.
- Ulrich D (2002) Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol* **87**, 2753–2759.
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J & Markram H (2004) Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the

somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* **561**, 65-90.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Disorganization of visual cortical θ -oscillation *in vitro* by pharmacological blockade of I_h . **A**, Spontaneous θ oscillations induced by 50 μ M carbachol (CCh) and 10 μ M bicuculline (Bic). Left, example of spontaneous θ -oscillation in the visual cortex recorded simultaneously in field potential (black trace) and from a L5 pyramidal neuron (blue trace). Lower graph, auto-correlation function of the extracellular (black) and intracellular (blue) signals. Red dots correspond to local extrema used to calculate the coefficient of oscillation and the amplitude of oscillation (see **Supplementary Figure 1** for details). Right, in the presence of the h-channel blocker ZD-7288, C_o increased (from 0.023 to 0.125) and A_o decreased (from 0.734 to 0.406). Note the increased number of spikes per θ episode (control: 13 spikes/episode, ZD-7288: 29 spikes/episode). **B**, Evoked θ oscillations in the neocortex. Field potential was recorded extracellularly in L5 of visual cortical slices and θ oscillations were evoked by electrical stimulation in L2/3 in the presence of 50 μ M CCh and 10 μ M Bic. Upper traces, evoked θ oscillations. The dashed square represents the analyzed signal (enlarged lower traces). Lower graph, normalized auto-correlation function of the selected signal. In control (left column), the field potential displayed an oscillation with a high coherence ($C_o=0.073$) and a large amplitude ($A_o=1.015$). In the presence of 1 μ M ZD-7288 (right column), the coherence and the amplitude of the oscillation decreased ($C_o=0.275$; $A_o=0.708$). **C**, Effects of ZD-7288 on the coefficient of oscillation (left) and the amplitude of oscillation (right) for spontaneous (black circles) and evoked θ oscillations (grey circles) recorded extracellularly.

Figure 2. Effects of h-channel blocker on hippocampal θ -oscillation. **A**, spontaneous oscillations induced by 50 μ M carbachol (CCh). Top traces, simultaneously whole-cell recording from a CA1 pyramidal neuron (CA1) and field potential in the CA3 region (Field, CA3). Lower left graph, auto-

correlation function of the extracellular (black) and intracellular (blue) signals. Note the regularity of oscillation with very small attenuation in the amplitude over >10 cycles ($Co=0.005$ and $Ao=1.7$). Lower right graph, cross-correlation function of the extracellular and intracellular signals. Note the robustness of the oscillation. *B*, carbachol evoked oscillations in the presence of 1 μ M ZD-7288. Top traces, intracellular (violet) and field potential (red) during θ oscillation. Note the attenuation in the oscillation amplitude after a few cycles in the auto- and cross-correlation functions.

Figure 3. I_h -dependent resonance in *stratum oriens* interneuron. *A*, Physiological characteristics of an oriens interneuron. Top, DIC-IR picture of the recorded neuron. Bottom, current-clamp response of the neuron. Note the presence of a large depolarizing sag in response to injection of hyperpolarizing current. *B*, Voltage-dependence of the resonance. Top, representative voltage profiles in response to a sinusoidal current, at two different membrane potentials (-60 mV) and (-68 mV). Middle graph, impedance profiles in the two conditions. Note that the peak frequency is slightly faster frequency at -68 mV (1.9 Hz). Lower graph, group data (n=8 cells) showing the peak frequency as a function of membrane potential (linear regression, $y = -0.037x - 1.016$, $R^2=0.88$). *C* and *D*, Effects of external Cs^+ on the impedance profile of an oriens interneuron.

Figure 4. I_h controls pacemaker activity in oriens interneurons. *A*, effect of external Cs^+ on pacemaker activity. Left, the cell was slightly depolarized by constant positive current to produce regular spiking activity. Right, firing pattern in the presence of 2 mM Cs^+ . *B*, analysis of pacemaker activity. Left, histograms of inter-spike intervals (ISI) in control (black histogram) and in the presence of Cs^+ (blue histogram). Right, coefficient of variation (CV) in control (\circ) and in the presence of Cs^+ (\circ) analyzed in 6 oriens interneurons. *C*, reduced rate of repolarization

during the AHP. Left, superimposed traces in control (black) and in the presence of Cs^+ (blue). Dashed vertical lines indicate the window where the slope has been measured. Right, voltage slope measured during the AHP decay in control (●) and in the presence of Cs^+ (●) in 6 oriens interneurons.

Figure 5. I_h determines precision of IPSP-spike coupling in CA1 pyramidal neurons. *A*, IPSP-spike sequences observed in a CA1 pyramidal neuron during θ episodes induced by CCh. APs (arrows) are truncated. *B*, IPSP-spike coupling assessed in CA1 pyramidal neurons. The neuron was held near its spike threshold (~ -50 mV) by injection constant current. Top traces, representative trials in control (left) and in the presence of 2.5 mM Cs^+ (right). Lower histograms, peri-stimulus time histograms of total spiking activity (filled histograms) and of the first spikes (empty histograms). Synaptic stimulation occurred at 400 ms. Histograms of the 1st spikes were fitted with Gaussian functions and in each case the deviation (σ) was determined. *C*, effect of Cs^+ on the deviation (σ) of the rebound spiking activity ($n = 7$ CA1 neurons). *D*, incidence of I_h on the decay of IPSP. Left, subthreshold traces averaged over 25 traces from the experiment illustrated in *B* (black trace, control; red trace Cs^+). Right, plot of the IPSP decay slope in control and in the presence of Cs^+ .

Figure 6. H-channels determine precision of EPSP-spike coupling in CA1 pyramidal neurons. *A*, EPSP-spike coupling during theta-oscillations. *B* and *C*, Effects of external Cs^+ (*B*) and ZD-7288 (*C*) on the precision of EPSP-spike coupling. In all cases, EPSPs were evoked in the presence of 100 μM PITX by the stimulation of the Schaffer collaterals to produce in nearly 50% of the trials a postsynaptic AP. Left, control condition. Top, representative traces. Bottom, histogram of postsynaptic APs. Right, EPSP-spike coupling in the presence of 2.5 mM Cs^+ (*B*) or 1 μM ZD-

7288 (C). *D*, Analysis of the standard deviation (SD) of AP latency in control and in the presence of h-channel blockers. *E*, Effect of h-channel blockers on the duration of the maximal depolarization of EPSP (90%). Top, representative traces in control (black) and in the presence of h-channel blockers (red). Bottom, quantification of the duration of the EPSP at 90% of its maximal amplitude. *F*, Normalized SD as a function of normalized EPSP duration at 90% induced by h-channel blockers. Black line, linear regression ($y = 5.07x - 632$, $R^2 = 0.84$).

Supplementary Figure 1. Analysis of the coefficient of oscillation (C_o) and amplitude of oscillation (A_o). *A*, Coefficient of oscillation (C_o). The first 6 extrema were detected on the autocorrelation function and the intervals (from I_1 to I_6) were measured. C_o was calculated as indicated by the equation (SD, standard deviation). In the present example, the oscillation was regular and C_o was small (0.073). *B*, Amplitude of oscillation (A_o). The amplitude was calculated as indicated by the equation. In this example, the oscillation is only slightly attenuated and A_o is large (1.015).

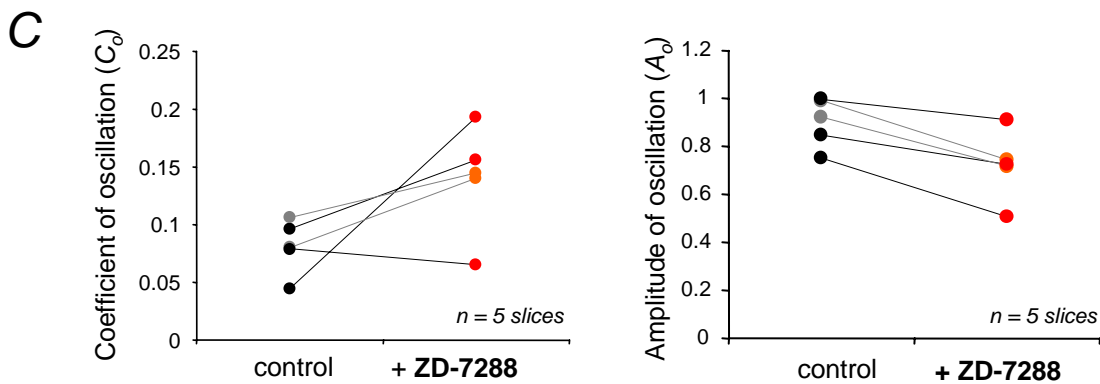
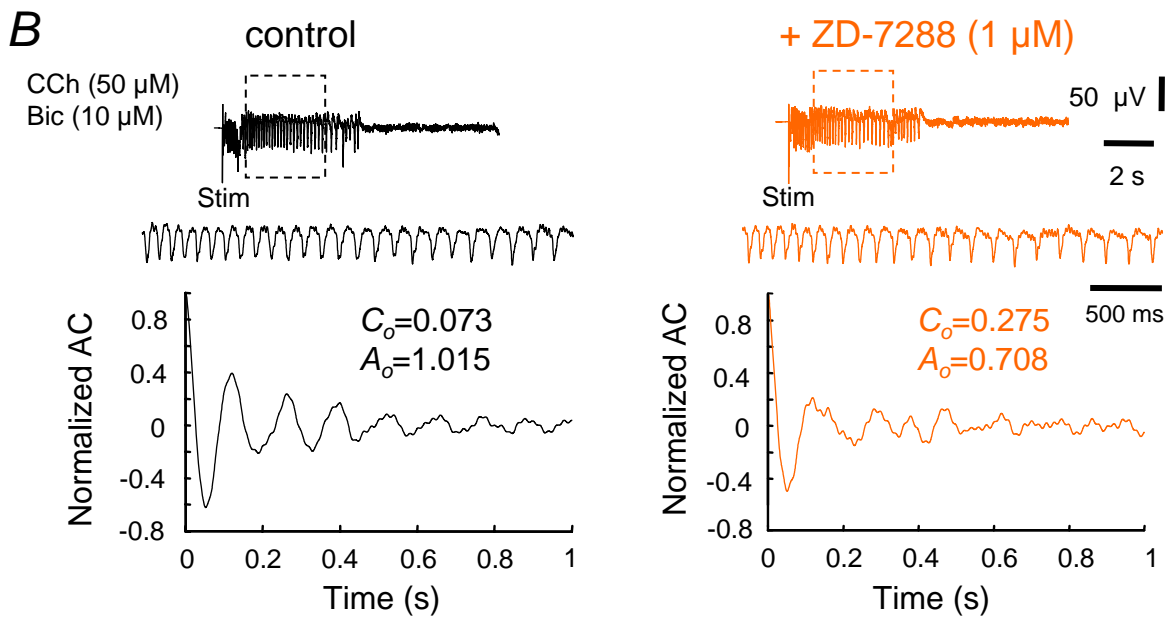
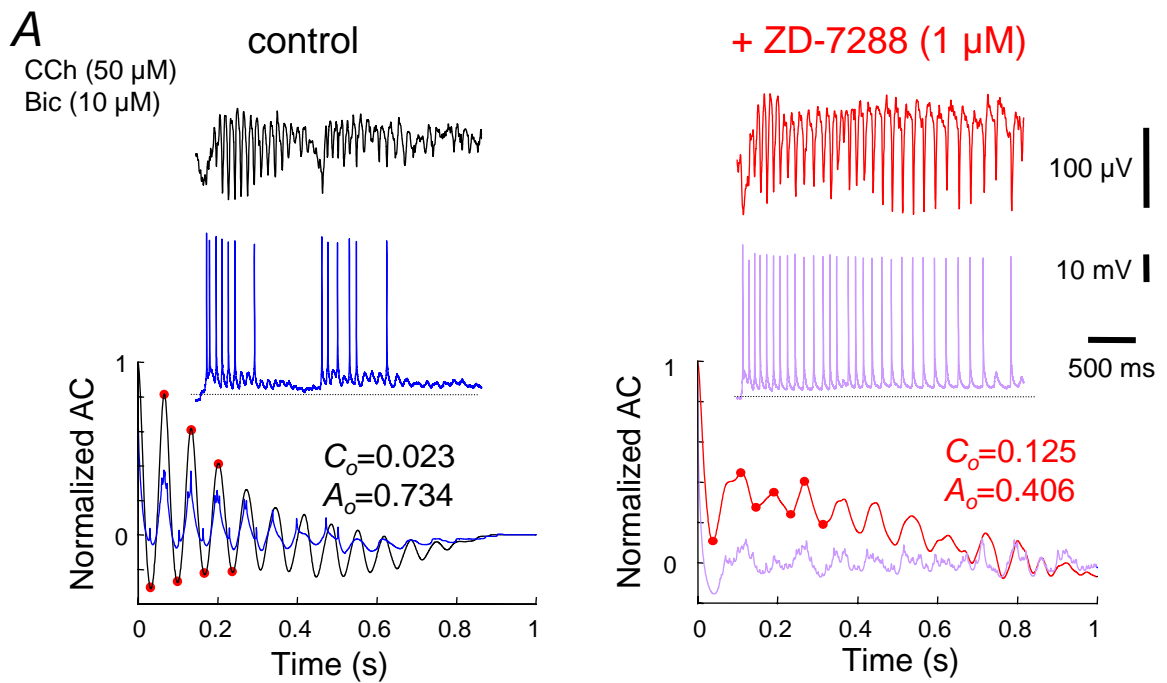


Figure 1

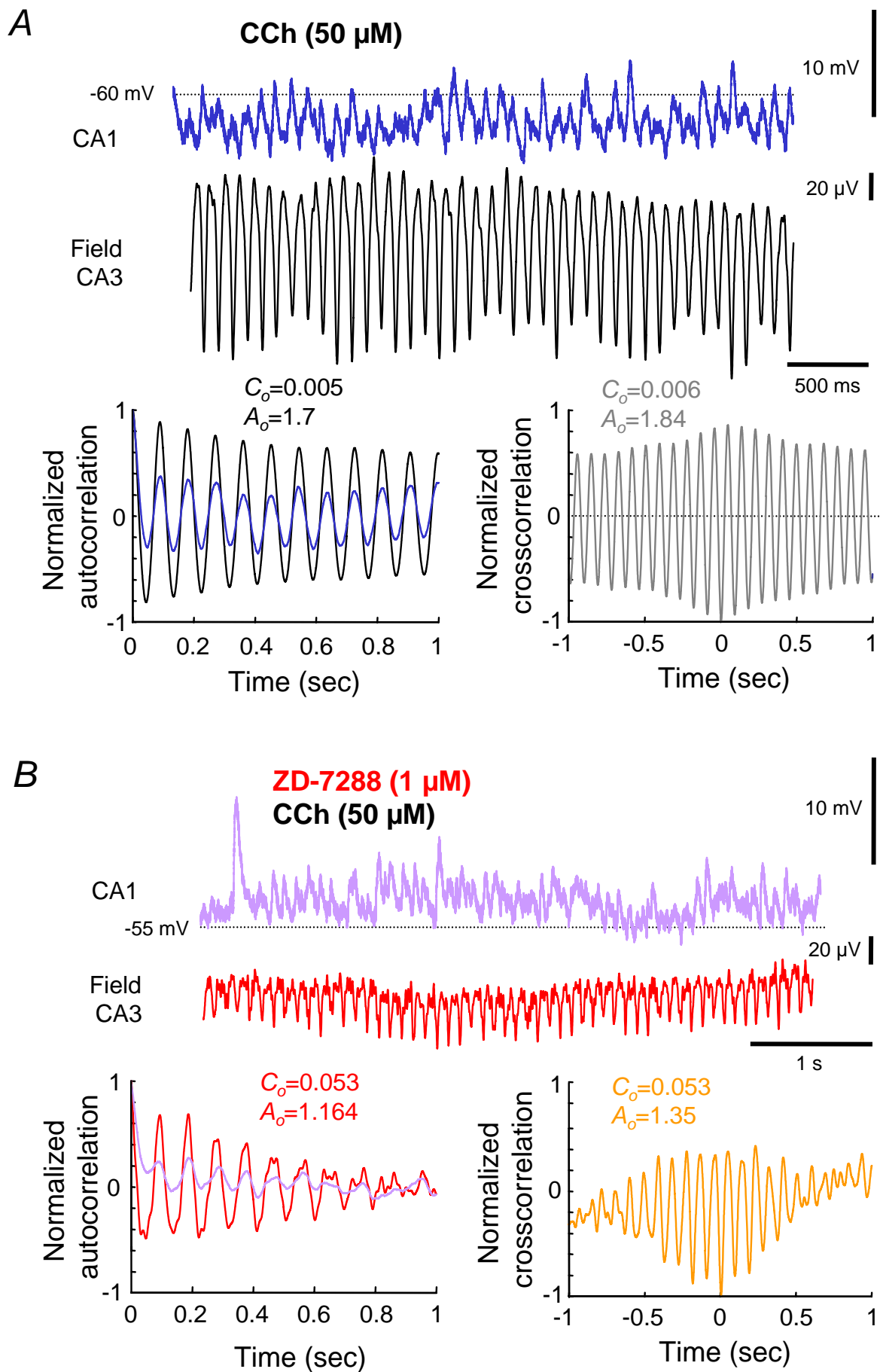


Figure 2

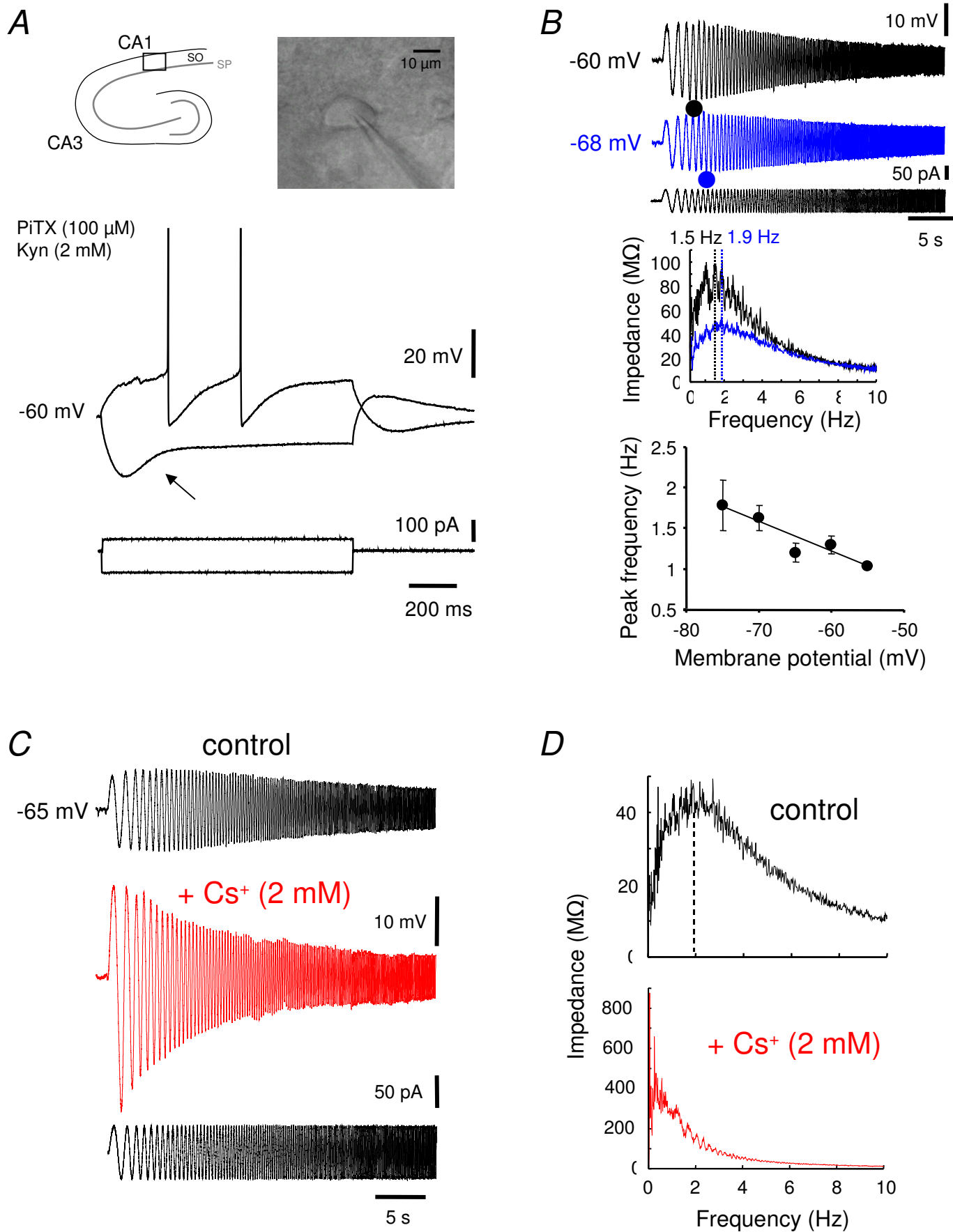


Figure 3

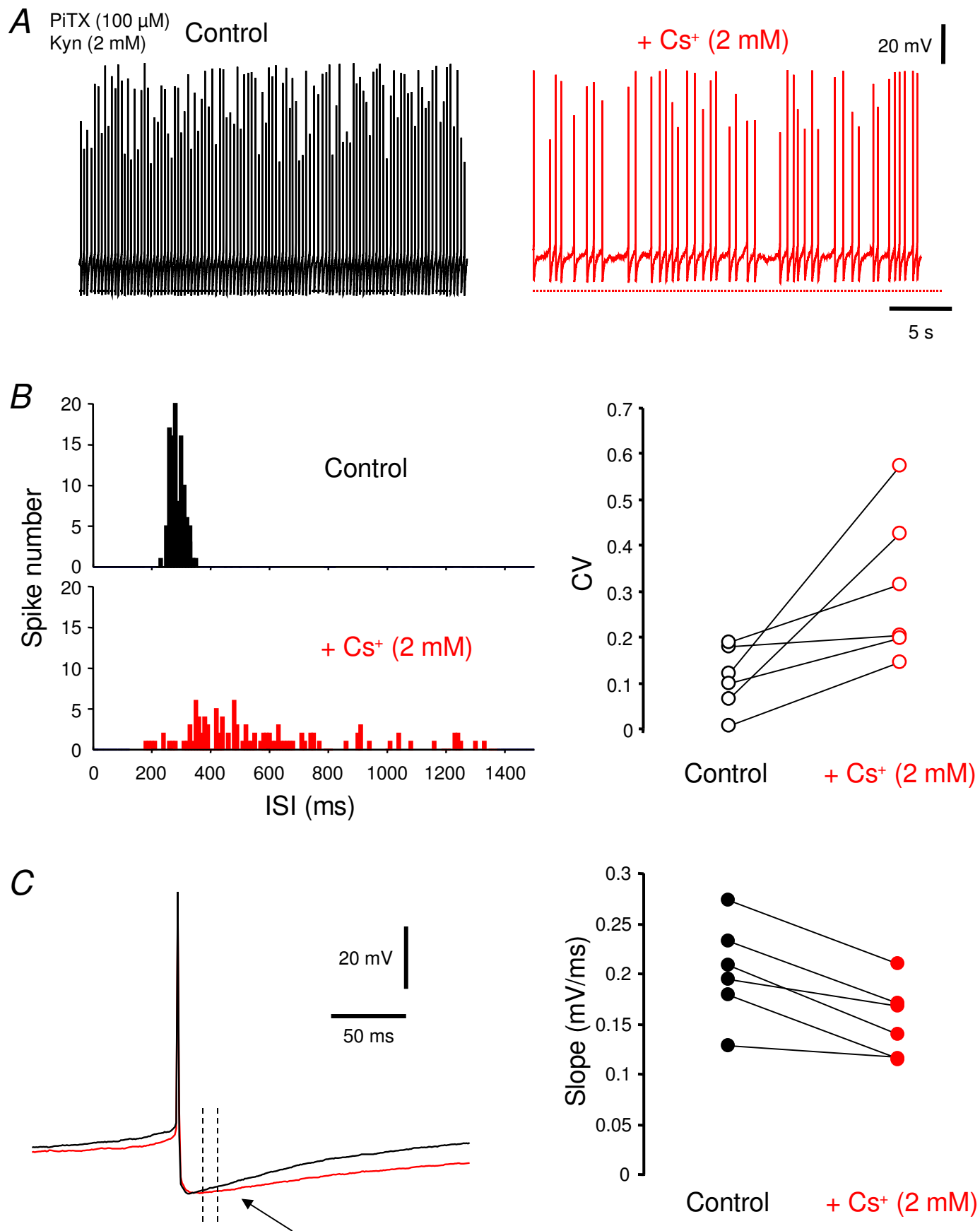


Figure 4

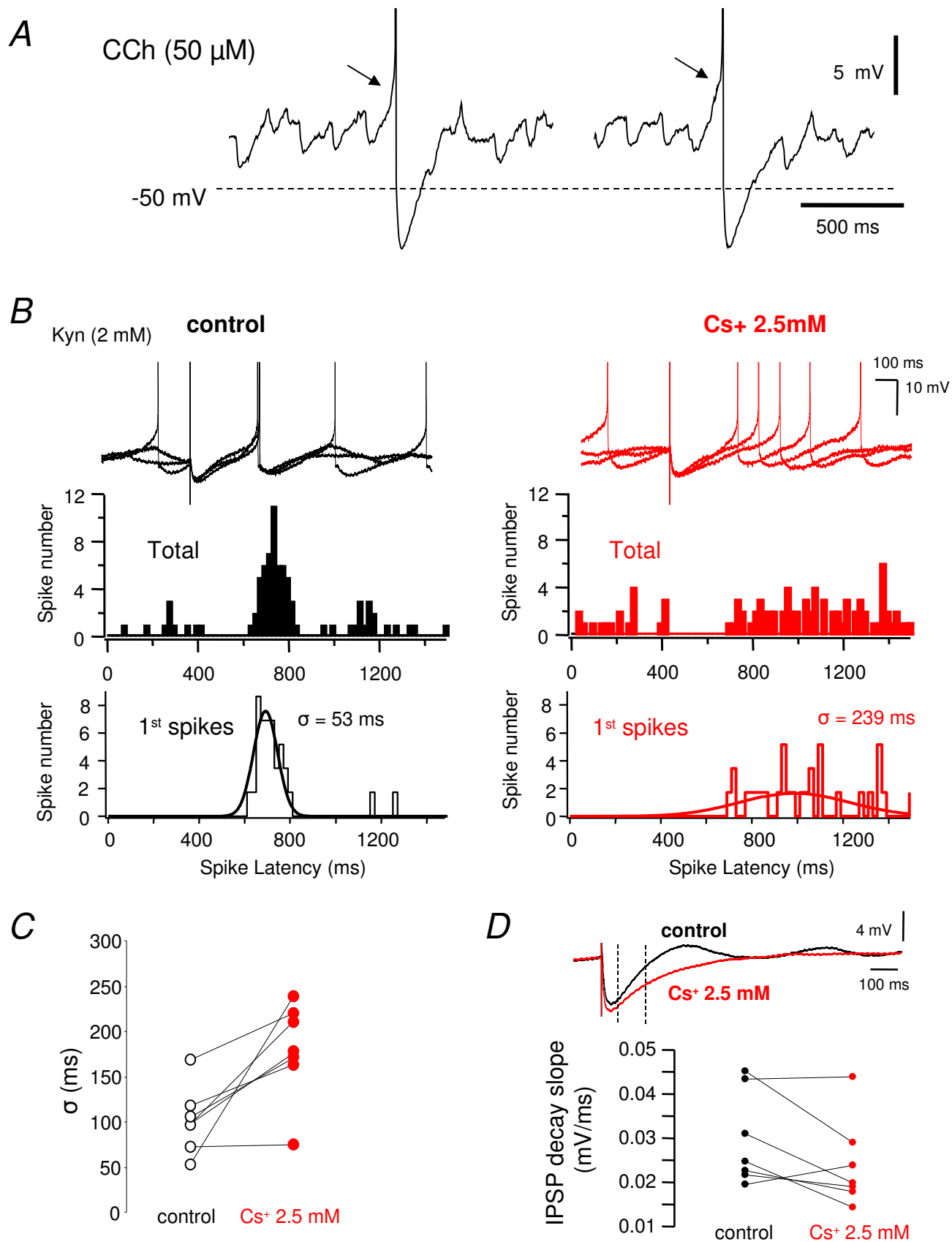


Figure 5

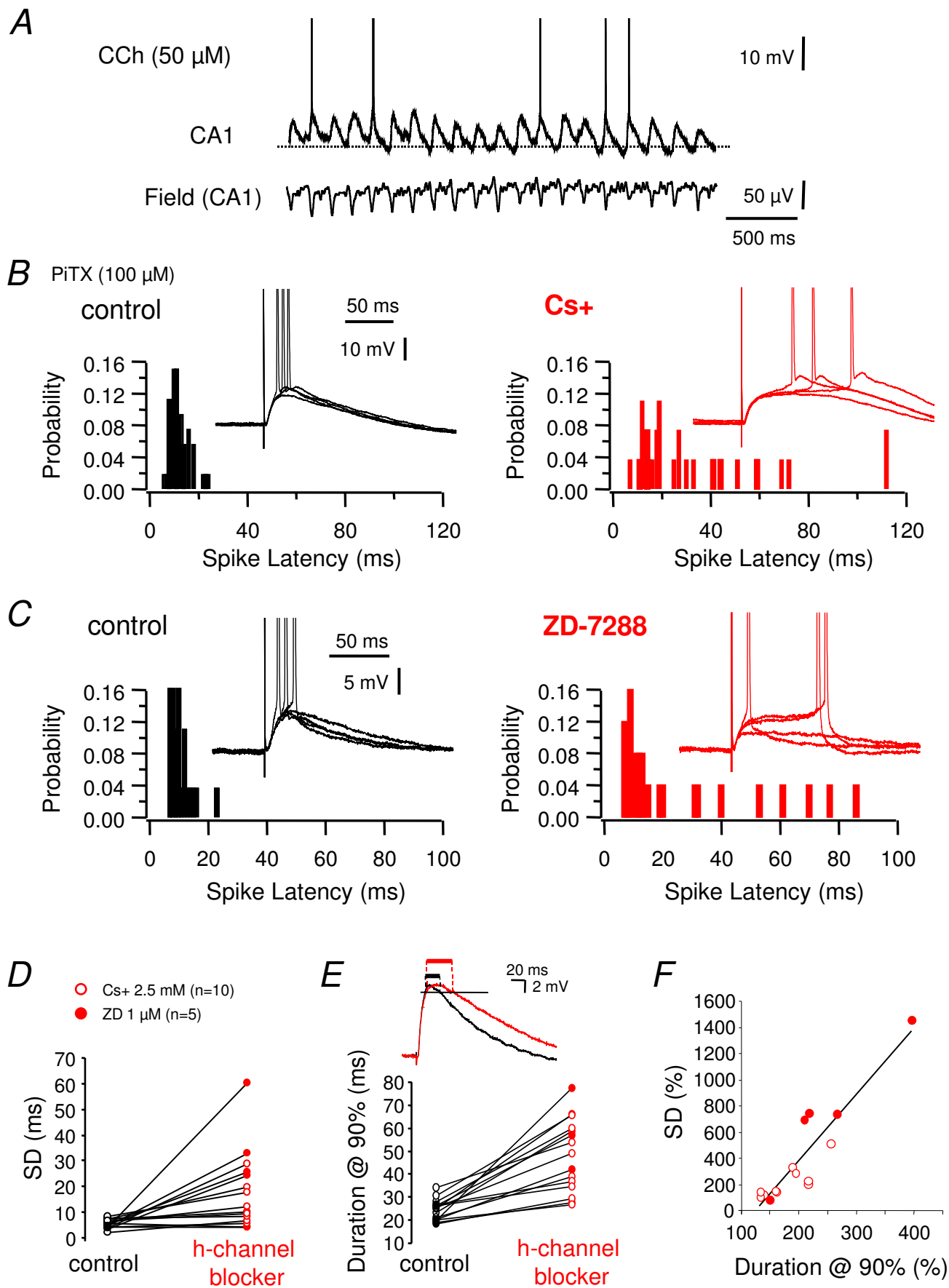
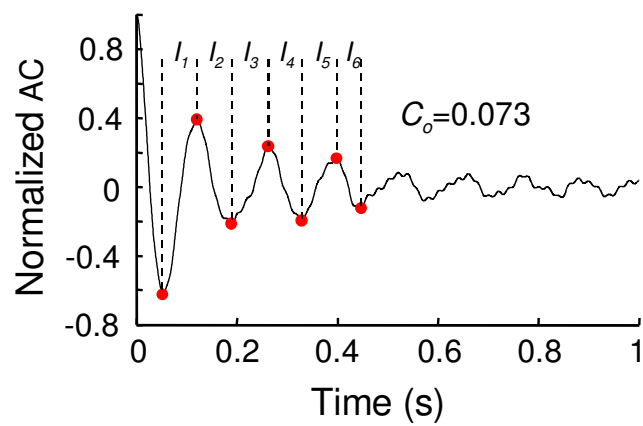
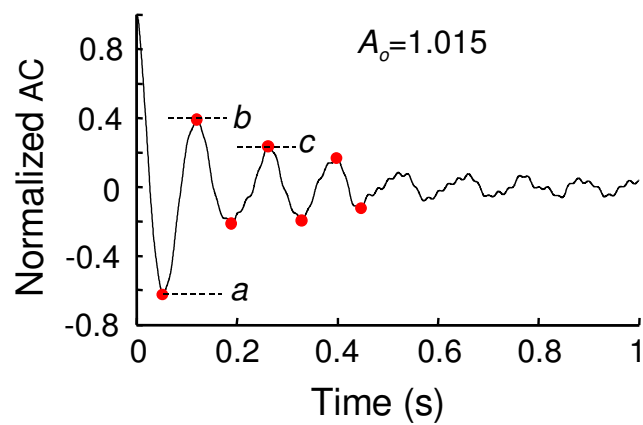


Figure 6

A $C_o = \text{SD} (I_n) / \text{mean} (I_n)$



B $A_o = [(b+c)/2] - a$



Chapitre 7

La variation de la concentration en
AMPC intracellulaire pendant des
oscillation θ dans des cultures
hippocampales organotypiques
influence la synchronisation des
oscillations et modulerait le courant
 I_H

Ô faites que jamais ne revienne
Le temps du sang et de la haine,
Car il y a des gens que j'aime
À Göttingen, à Göttingen.
Et lorsque sonnerait l'alarme,
S'il fallait reprendre les armes,
mon cœur verserait une larme
pour Göttingen, pour Göttingen.
Barbara

Ce qui suit constitue les résultats préliminaires d'un travail en cours au sein de l'équipe de Peter Salonikidis, Center for Molecular Physiology of the Brain, Institute for Physiology and Pathophysiology Department of Neuro- and Sensory Physiology Humboldtallee 23, 37073 Goettingen, Germany

Variation of intracellular cAMP concentration during theta oscillations in organotypic hippocampal culture

Philippe Gastrein, Dagmar Czran, Diethelm W. Richter, Peter Salonikidis

Abstract

cAMP is a second messenger which activates or modulates several ionic currents like the hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-modulated current (I_H). In the hippocampus activation of several membrane receptors like NMDA receptors, β_1 -adrenergic receptors or 5HT₇-serotonergic receptors stimulates the production of cAMP. The variations of intracellular cAMP concentration ($[cAMP]_i$) during network activity remain however puzzling. New molecular FRET-based cAMP sensor allows to follow variations of $[cAMP]_i$ in living cells. We studied here variations of $[cAMP]_i$ in cAMP sensor-transfected cells from organotypic hippocampal cultures during network oscillations. Simultaneous whole-cell current clamp recordings from neighbouring neurons were obtained to monitor network activity.

We observed an increase in $[cAMP]_i$ following carbachol-induced and spontaneous θ oscillations. Elevation of cAMP seemed to accelerate I_H after every spontaneous θ oscillation. Synchronisation, regularity and period of spontaneous oscillations increased systematically between the beginning and the end of θ oscillations. Blockade of I_H suppressed changes in oscillations during oscillatory episodes. The increase of cAMP began in the periphery of the cells and spread to the soma at velocities slower than free diffusion.

We hypothesise that synchronised synaptic activity, as θ oscillations, stimulates a production of cAMP, probably in the dendrites as a result of Ca^{2+} entry through NMDAR. cAMP modulates I_H properties by shifting its activation curve and accelerating its kinetics. These changes in I_H properties may result in a higher synchronisation of θ oscillations.

7.1 Introduction

cAMP is a second messenger which is involved in several intracellular signalling pathways [Cooper, 2005]. In the hippocampus, cAMP can be produced by Ca^{2+} -dependent (AC1, AC8 and AC9) and G-protein-dependent (AC2 and AC4) adenylylate cyclases [Chern, 2000]. cAMP modulates or activates the gating of membrane channels like hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-modulated (HCN) channels and cyclic-nucleotide gated (CNG) channels [Craven and Zagotta, 2005]. cAMP represents a means to control the function of a neuron through the regulation of ion channel activity. cAMP is also involved in several mechanisms of plasticity such as mossy-fiber LTP [Wong et al., 1999]. In the hippocampus, the quantity of cAMP increases after activation of NMDA receptors [Chetkovich and Sweatt, 1993][Vanhoose and Winder, 2003] and after activation of β 1-adrenergic receptors [Vanhoose and Winder, 2003].

In the hippocampus *in vitro*, θ -oscillations can be generated autonomously following activation of muscarinic receptors [Konopacki et al., 1987] or with activation of mGluR receptors [Gillies et al., 2002].

Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide current (I_H) is involved in the synchronisation of θ oscillations in cortical structures by (i) generating pacemaker activity in interneurons [Maccaferri and McBain, 1996][Gillies et al., 2002][Gastrein et al., 2007], (ii) defining intrinsic membrane resonance in each cell which is involved in network oscillation [Hu et al., 2002][Ulrich, 2002][Wang et al., 2006][Gastrein et al., 2007], (iii) improving timing precision of spike in response to IPSP and/or (iv) EPSP [Gastrein et al., 2007]. I_H improves synchronisation of network oscillation at θ frequency at each of these steps because I_H is slowly activated and deactivated with a time constant corresponding to θ frequency.

Direct binding between HCN channels (I_H -current channels) and cAMP accelerates I_H kinetics and shifts the activation curve to more depolarised voltage [Wainger et al., 2001]. Ca^{2+} -induced cAMP production modulates I_H in thalamocortical neurons during oscillations [Lüthi and McCormick, 1999]. The transient up-regulation of I_H by cAMP generates a slow periodicity in synchronised thalamocortical oscillations [Lüthi and McCormick, 1998b]. We determined whether such a mechanism occurs in the hippocampus during θ -oscillations.

We addressed this question using a new cAMP sensor which was obtained by the fusion of the protein Epac1 with CFP at its amino terminal end and with YFP at its carboxy terminal end. CFP and YFP are a well-known pair for Förster resonance energy transfer (FRET). In the absence of cAMP, Epac1 is folded and the distance between CFP and YFP is close to the Förster distance. Elevating cAMP concentration leads to an unfold-

ding of the CFP-Epac1-YFP construct, and a subsequent decrease of FRET efficiency [Ponsioen et al., 2004]. Cells in organotypic hippocampal culture were transfected with the CFP-Epac1-YFP construct. In these cells, measurements of cAMP concentrations were obtained through optical recordings of the FRET efficiency. In parallel, spontaneous or evoked network activity was monitored with the use of whole-cell electrophysiological recording from principal cells.

Here we report a strong increase in intracellular cAMP concentration after induction of θ oscillations with the muscarinic agonist carbachol. The production of cAMP seems to be independent of direct activation of muscarinic receptors because it occurs with a long delay (200 s) after carbachol-induced membrane depolarisation, the known effect of muscarinic activation. The production of cAMP begins in peripheral parts of cells and spreads to the soma. Spontaneous synaptic activities evoke a transient increase of cAMP. We observed in some cases spontaneous θ oscillations which also evoke transient elevation in cAMP concentration. Spontaneous θ oscillations were found to be more regular at the end of oscillatory episodes, when $[cAMP]_i$ was maximal.

7.2 Material and Method

7.2.1 Organotypic cultures

Organotypic hippocampal cultures were prepared following the method describe by Gähwiler [Gähwiler, 1981][Gähwiler, 1988]. Hippocampal slice cultures were prepared from 5-6 day-old mice killed by decapitation. All experiments were carried out according to Tierschutzgesetz : §4 Absatz 3 "Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken". Cultures were maintained for 1-2 weeks at 38°C *in vitro* in closed roller-tubes. The rotation speed was 19 revolutions/hr. The culture medium contained chicken plasma (Cocalico) and was changed twice a week. Cultures were exposed to antimitotic drugs 24 hours once weekly to avoid non.neuronal proliferation.

7.2.2 cAMP sensor

Description The organotypic hippocampal cultures were transfected with a plasmid containing CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP (construct provided by Dr. Kees Jalink) [Ponsioen et al., 2004]. This construct consists of an exchange protein directly activated by cAMP (Epac1) which is assumed to unfold after binding to cAMP. It is fused with a cyan fluorescent protein (CFP) at the N-terminus and a yellow fluorescent protein (YFP)

at the C-terminus. Because the excitation spectrum of YFP overlaps with the emission spectrum of CFP, FRET can occur between both fluorophores. If the distance between CFP and YFP is close to the Förster distance, the energy used to excite CFP is not entirely converted into emitted light of the CFP emission spectrum, but excites YFP which emits light of the YFP emission spectrum. The ratio between the intensity of the emitted light by CFP and the intensity of the emitted light by YFP describes the FRET efficiency [Förster, 1948][Lakowicz, 2006]. In the absence of cAMP, CFP-EPAC-YFP is folded and both fluorescent proteins at close proximity to produce maximal FRET. In the presence of cAMP, Epac1 unfolds and the distance between CFP and YFP increases. The efficiency of FRET decreases (Figure.7.1). In this set of measurements we were able only to follow relative change of $[cAMP]_i$.

In order to have a cytosolic cAMP sensor, the DEP domain of Epac1 is deleted. The DEP domain is the main determinant of membrane localisation. Indeed this construct localised almost exclusively in cytosol. This mutation also diminished Epac's ability to activate Rap1 significantly [Ponsioen et al., 2004]. We assume so that overexpression of CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP does not disturb signalling in transfected cells. Furthermore the signal-to-noise ratio (SNR) of FRET measurement is better with this mutant compared to the wild Epac1 [Ponsioen et al., 2004].

Transfection The transfection was done with 1 μ g CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP containing pCDNA3(amp) plasmid, 4 μ L lipofectamin (Lipofectamine 2000 / Invitrogen), 100 μ L OptiMEM for each probe. Cultures were incubated 2-3 hours with lipofectamin and DNA. Experiments were done after 12-18 hours of expression.

Imaging and FRET measuring

Localisation of transfected cells Identification and localisation of transfected cell was done with an excitation light for YFP at 472/20 nm to avoid CFP photobleaching. The emission light was filtered by a 500 nm long-pass filter (HQ500LP, Firma AHF analysentechnik / Tübingen). All data are presented as superimposed transmitted (blue) and YFP-fluorescence (red) images. Low magnification pictures were taken with a 40X 0.8 NA objective (LUMPlanFI), and high magnification with a water immersion 60X 1.1 NA objective (LUMFI). Images were captured with an iXon camera (AndorTechnology). No further identification of the selected cells were done. The electrophysiological characterisation of transfected cells has been determined in only one case. (a granule cell in the dentate gyrus; Fig.7.5) But we try to choose polarised cells.

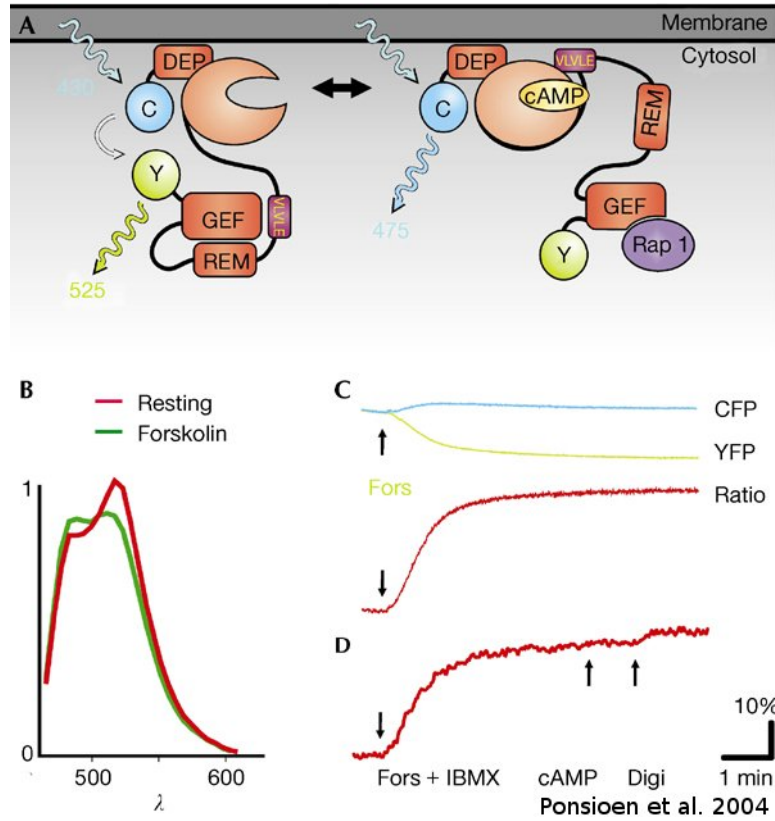


Fig. 7.1: cAMP sensor : Epac1 fused with CFP and YFP

cAMP-induced variation of FRET efficiency. (A) Model for the conformational change following binding of cAMP to Epac1. (B) Emission spectra of CFP-Epac-YFP excited at 430 nm. Red line, resting level; green line, 3 min after forskolin treatment (25 μM). (C) Time course of cAMP-induced CFP-Epac-YFP activation, monitored in A431 cells by FRET. Increase in the ratio CFP/YFP reflect unfolding of Epac1. Arrow, addition of forskolin. (D) Cells were treated with forskolin and IBMX (100 μM) and subsequently permeabilised using digitonin (10 $\mu g/ml$) in the presence of 2 μM cAMP. From [Ponsioen et al., 2004]

Fluorescence Ratio Microscopy The fluorescence ratio measurements has been recently published [Ponimaskin et al., 2007]. Therefore we will briefly describe the set-up. We used an up-right epifluorescent microscope, where the excitation light as well as the emitting light passes the same objective. The microscope was equipped with an immersion objective from Olympus (LUMFI) with 60X magnification and $NA = 1.1$. The excitation light coming from a 100-W xenon lamp connected to a monochromator (Optoscan, Kinetic Imaging) and light fibber was filtered at 436/20 nm. Subsequently it was reflected by a 455 nm dichroic mirror into the objective pathway in order to excite the specimen. The 455 nm dichroic mirror passes the emission light of CFP and YFP collected by the objective to an image splitter. A set of dichroic filters and mirrors splits the emitted and collimated light from the specimen in two spectrally separated light channels. The CFP channel was filtered by a filter of 470/30 nm and the YFP channel by a filter of 535/30 nm (515 nm for the dichroic mirror). We used the iXon camera from AndorTechnology with an electron-multiplying CCD chip (EMCCD) running it with a frame rate of 10Hz (Figure.7.2).

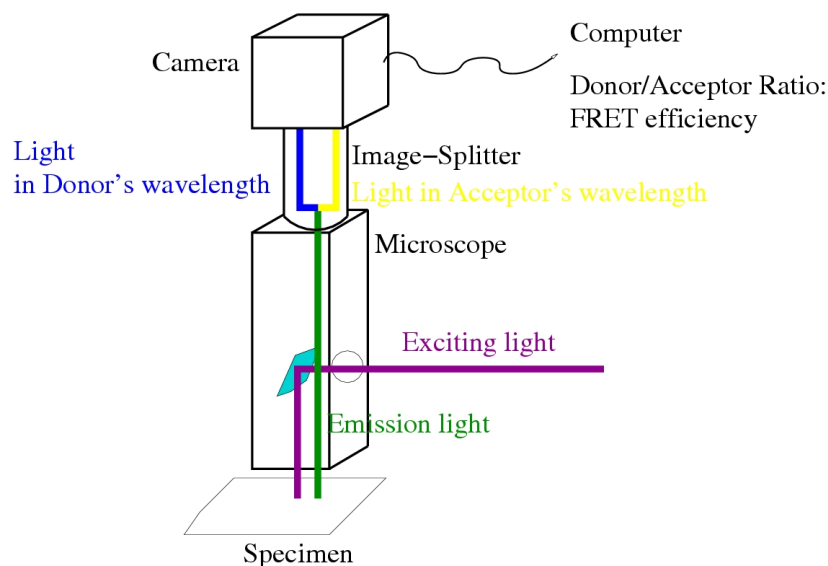


Fig. 7.2: Optical set-up for FRET measure

Calculating changes in Förster Resonance Energy Transfer (FRET) A widely used algorithm to calculate FRET has been proposed by Gordon [Gordon et al., 1998] for measurements with only two emission filters and one excitation wave length. The ratio between the emission intensities deriving from CFP (F_{fa}) and those deriving from YFP (D_{fd}), F_{fa}/D_{fd} is used as a FRET equivalent measure, whereas FRET is inversely proportional to the ratio. Because of spectral overlap between the emission spectra of CFP and YFP a cross-talk correction must be applied (described in Ponimaskin et al.

[Gordon et al., 1998]). Considering the filter-sets in the microscope we obtain following relation for the Ffa/Dfd ratio :

$$\frac{Ffa}{Dfd} = \frac{Ff - Df \cdot 0.63}{Df} \quad (7.1)$$

where Df is the fluorescence light intensity deriving from the CFP channel and Ff the fluorescence light intensity from the YFP channel. Signals from Df as well as Ff were background subtracted. Although the measure of FRET was corrected for cross-talk, FRET and non-FRET signals were not separated. Consequently, absolute values of cAMP concentration could not be measured, but rather time-dependent relative changes in cAMP concentration could be evaluated.

Time protocol Samples were illuminated at the the excitation light (436/20 nm) during 100 ms every 8 seconds. One picture was captured simultaneously in both channels (CFP channel : 470/30 nm ; YFP channel : 535/30 nm). Between records, the monochromator was switched to UV light (320/20 nm) which did not excite YFP or CFP. This time interval avoids cumulative photobleaching. All records were done in a dark room.

7.2.3 Electrophysiology

FRET and electrophysiological measurements were done in a recording chamber at room temperature filled with a translucent extracellular solution (Tyrode's solution : in mM KCl, 2 ; CaCl, 2 ; MgCl, 1 ; HEPES, 10 ; NaCl, 126 ; D-(+)-glucose monohydrate, 10 ; 330 mOsm). Cells for electrophysiological measurement were chosen close to selected transfected cells, in the closest principal cells layer. Whole cell recordings were done with electrodes filled with an internal solution containing (in mM) : K-Gluconate 150 ; NaCl 10 ; MgCl₂ 5.5 ; CaCl₂ 0.7 ; EGTA 3 ; MOPS 10 ; ATP-Na 2 (330 mOsm, pH = 7.35).

Drugs Carbachol 50 μ M (muscarinic receptors agonist) ; ZD7288 1 μ M (specific I_H channels antagonist) ;

Data acquisition and analysis Electrophysiological recordings were obtained using EPC10 amplifier (HEKA). Data acquisition was done with Pulse 8.8 software.

Autocorrelogramms and characterisation of regularity (coefficient of oscillation, Co) and synchronisation (amplitude of oscillations, Ao) of oscillations were compu-

ted with home-made perl programmes (see method in prior work Chapitre 6, [Gastrein et al., 2007]).

7.3 Results

7.3.1 Activation of cAMP production increase the CFP/YFP ratio in CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP transfected cells

We first designed a simple experiment to validate the optical method of $[cAMP]_i$ measurement with the Epac sensor. For this, neuroblastoma glioma cells N1E-115 were transfected with the Epac construct CFP-Epac(δ DEP-CD)-YFP and the serotonin receptor 5-*HT*₇, which is known to activate the adenylate cyclase (AC) via G_s -protein upon stimulation with an agonist [Bickmeyer et al., 2002]. The measurement consisted in a series of 400 images taken with a frame rate of 1/sec. In order to prevent strong bleaching of the fluorophores by excitation, light exposure time was reduced. A good signal-to-noise ratio was obtained using 100 msec exposure time. For the remaining time of the cycle (900 msec) excitation light was turned off by a shutter.

5-*HT*₇ receptor was stimulated with 5-carboxamidotryptamine (5-CT), a selective 5-*HT*₇ receptor agonist.

5-CT was applied with an inline solution application MPRE8 (Cell Micro Controls) directly on top of the respective cell, which allows a solution exchange in few seconds.

The intensity traces in Figure.7.3 show the values for the CFP emission intensity, for the cross-talk corrected YFP emission intensity (see method) and the resulting CFP/YFP ratio. This ratio is inversely proportional to FRET. The traces were normalised to the value 1 at the first 50 msec.

Figure.7.3 shows clearly an increase of CFP/YFP (e.g. decrease of FRET) after application of 5-CT on the cell ($n = 5$ cells). Elevating $[cAMP]_i$ by direct activation of adenylate cyclase with forskolin in the same conditions leads also to an increase of CFP/YFP ratio ($n = 7$ cells). After application of 5-CT, cAMP level remains high for a few minutes before returning to the basal level.

In conclusion, this experiment demonstrates that intracellular production of cAMP in CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP neuronal transfected cells provokes an increase of the CFP/YFP ratio. We validate the cAMP sensor.

Similar results were obtained with direct activation of adenylate cyclase by forskolin.

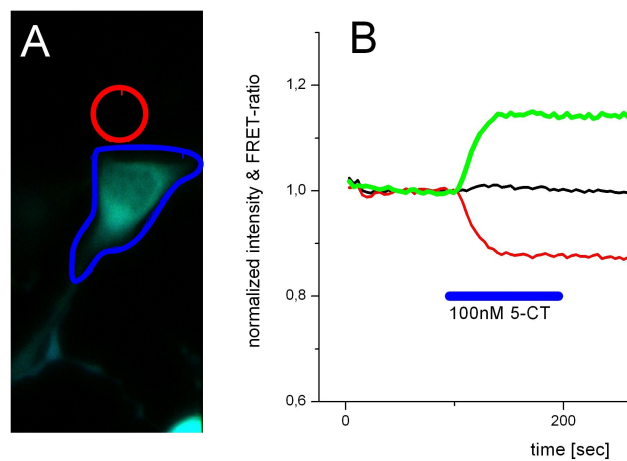


Fig. 7.3: CFP/YFP ratio from cAMP sensor increase with activation of cAMP production in neuron-type cells

Left : superimposed pictures of both emission channels. Blue area : selected area for FRET measuring; Red area : selected area for reference background. Right : Decrease of YFP light intensity (red), increase of CFP light intensity (black) and increase of resulting ratio (green) after activation of 5-*HT*₇ receptor (each trace is normalised to the 50 first ms).

7.3.2 Network activity induces elevation of $[cAMP]_i$

cAMP sensors have already been used in cardiac cells to determine compartmentalisation of cAMP production [Zaccolo and Pozzan, 2002]. However changes in $[cAMP]_i$ have never been monitored during neuronal network activity.

To address this question, we measured changes in $[cAMP]_i$ in hippocampal cultures at the cell level during physiological activity. Experimental and theoretical studies described the importance of NMDAR and HCN for the generation and the synchronisation of hippocampal θ -oscillations [Gillies et al., 2002][Orban et al., 2006][Gastrein et al., 2007]. Tetanic stimulation of glutamatergic Schaffer collateral inputs into CA1 pyramidal neurons increases the quantity of cAMP in CA1 tissue in a NMDAR-dependent way [Chetkovich et al., 1991]. I_H is strongly modulated by variations of $[cAMP]_i$ [DiFrancesco and Tortora, 1991][Pape, 1996]. For these reasons, we chosen to study variations of $[cAMP]_i$ during hippocampal θ -oscillations.

$[cAMP]_i$ increases after carbachol-induced θ -oscillations

Activation of muscarinic receptors induces a depolarisation of hippocampal neurons through inhibition of I_M [Halliwell and Adams, 1982]. The subsequent increase of excitability in the network leads to synchronised oscillations around θ -frequency *in vitro* [Konopacki et al., 1987] and in organotypic culture [Fischer et al., 1999] (Fig.7.4-A, top & B; Fig.7.5-C, top & D).

Principal cells of stratum pyramidale in areas CA1, CA3 and in the dentate gyrus (DG) were recorded in current clamp with simultaneous FRET measurement of neighbouring (less than 200 μm distances) cAMP-sensor-transfected cells (example in Fig.7.4-A; Fig.7.5-C). Images of emission in both channels were recorded every 8 s with an exposure time of 200 ms. Between image capture excitation light was switched to UV wavelength (320 nm).

After bath application of carbachol (50 μM), all neurons were depolarised, the synaptic activity increased and after 5 to 10 minutes synchronised θ -oscillations began (Fig.7.4-B; Fig.7.5-D). In parallel, $[cAMP]_i$ increased after network oscillations. The delay between the carbachol-induced depolarisation and the increase of $[cAMP]_i$ was : $\Delta T = 285s \pm 140s$ SD (n = 15, Tab.7.1; ΔT : delay between the half-time of the depolarisation and the half-time of $[cAMP]_i$ increase; both half-times derive from fits with Boltzmann function, Fig.7.4-D). The increase in the CFP/YFP ratio was followed by a plateau. This plateau corresponded to a stabilisation of $[cAMP]_i$ or to saturation of cAMP-Epac1 binding.

We observe increase of $[cAMP]_i$ in a majority of transfected cells (17/22) after adding

carbachol in the bath. We can conclude that activation by carbachol of network activity in hippocampus increases $[cAMP]_i$ in several cell types.

Name	transfected cell	patched cell	ΔT (s)
OrgC9	CA4 <i>str. pyr.</i>	CA4 giant pyramidal cell	252
OrgC11	DG gr. c. layer	DG interneuron	222
OrgC12	subiculum (X2)	subiculum pyramidal cell	278, 317
08C1	CA1 <i>str. rad.</i>	CA1 pyramidal cell	645
08C2	DG gr. c. layer (X2)	DG granule cell	234, 274
11C1	CA1 <i>str. pyr.</i>	CA1 interneuron	196
11C2	DG gr. c. layer	DG granule cell	590
23C2 ²	DG granule cell*	DG granule cell*	200
24C1	CA3 <i>str. pyr.</i>	CA3 pyramidal cell	237
24C2	DG gr .c. layer	DG granule cell	223
24C3	CA1 <i>str. pyr.</i>	CA1 pyramidal cell	229
25C1	CA1 <i>str. pyr.</i>	CA1 pyramidal cell	180
25C2 ¹	CA1 <i>str. pyr.</i>	CA1 pyramidal cell	201

Tab. 7.1: Time shift between carbachol-induced depolarisation and network synaptic activity-induced production of cAMP

time shifts ΔT are calculated between half-times of depolarisation and half-time of cAMP elevation. *the transfected cell was electrophysiological recorded 1 : Example in Fig.7.4; 2 : Example in Fig.7.5.

Legend : Figure 7.4 : cAMP production follows carbachol-induced θ -oscillations in neighbouring cells

A) whole cell current clamp record of a CA1 pyramidal cell (black, top) and CFP/YFP ratio measurement of a *stratum pyramidale* neighbouring cAMP-sensor-transfected cell (red, bottom) during application of carbachol ($50 \mu M$, barre). Bigger is the CFP/YFP ratio, lower is the FRET efficiency, higher is the intracellular cAMP concentration. The cAMP concentration begins to increase after the begin of θ -oscillations.

B) Details of current clamp record : (1) in control, up/down like activity ; (2) depolarisation due to inhibition of I_M through the activation of muscarinic receptors ; (3) synchronised θ -oscillations due to network activity. Insets in top of (2) and (3) : autocorrelograms of with dotted rectangle-selected areas.

C) Localisation of both cell (left) : Superposition of transmitted light picture in blue and of fluorescence ($\lambda_{excitation} = 472 \text{ nm}$). top : small magnification, bottom : large magnification (scale barre : $100 \mu m$) ; One can see the tip of the micropipette. Electrophysiological characteristics of the patched cell (right) : response to positive (+30 pA, top) and negative (-70 pA) square current pulses. Note sag and depolarisation rebound.

D) Definition of the time shift between the activation of muscarinic receptors and production of cAMP : averaged RMP each 8 s (black circle) and CFP/YFP ratio measured each 8 s (empty circle) are normalised between control and final values and fitted with a Boltzmann function (RMP : blue curve ; $[cAMP]_i$: red curve) ; the half times are considered to evaluate the time shift ($\Delta T = T_{\frac{1}{2}}^{cAMP} - T_{\frac{1}{2}}^{RMP}$)

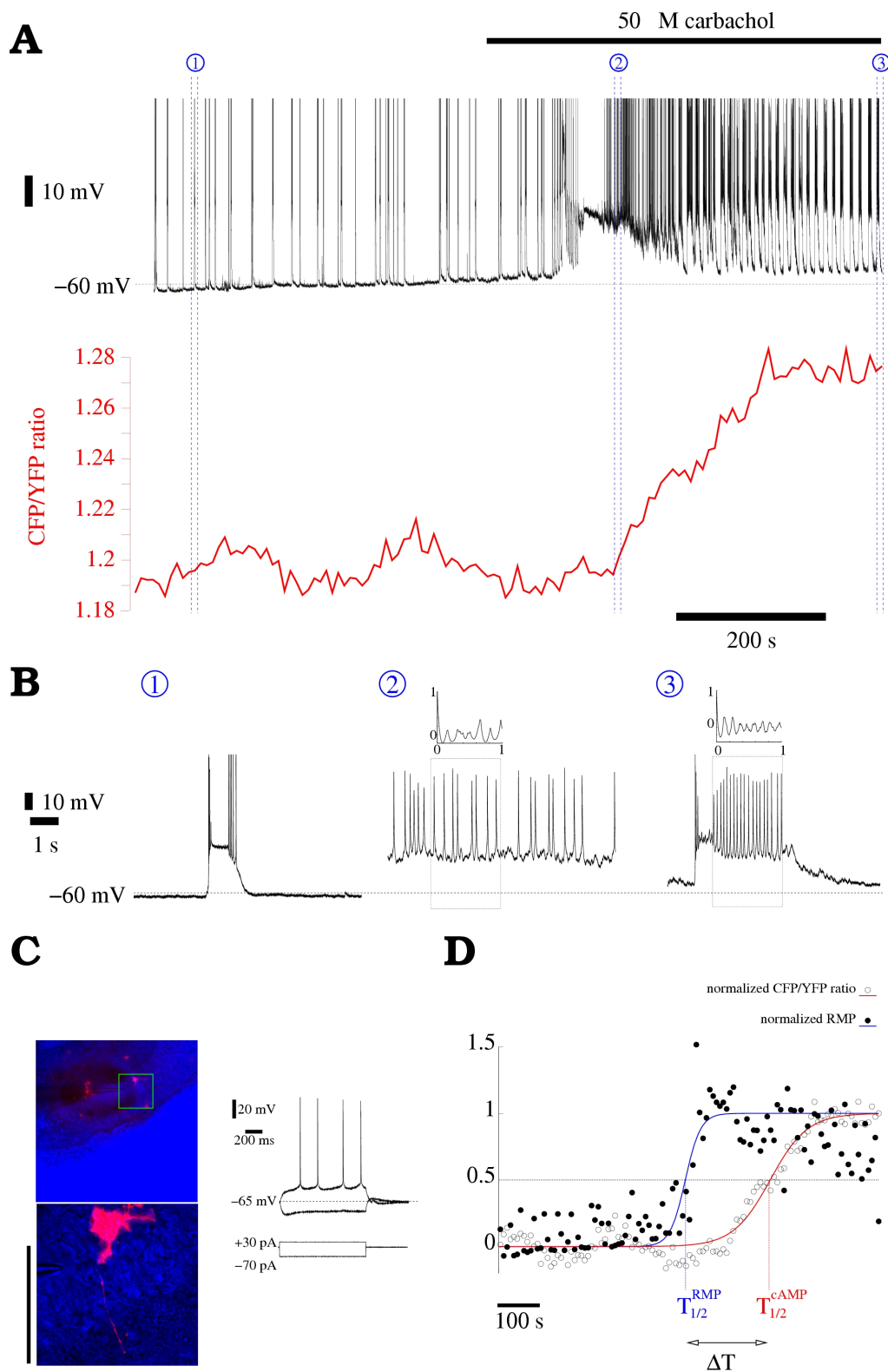


Fig. 7.4: cAMP production follows carbachol-induced θ -oscillations

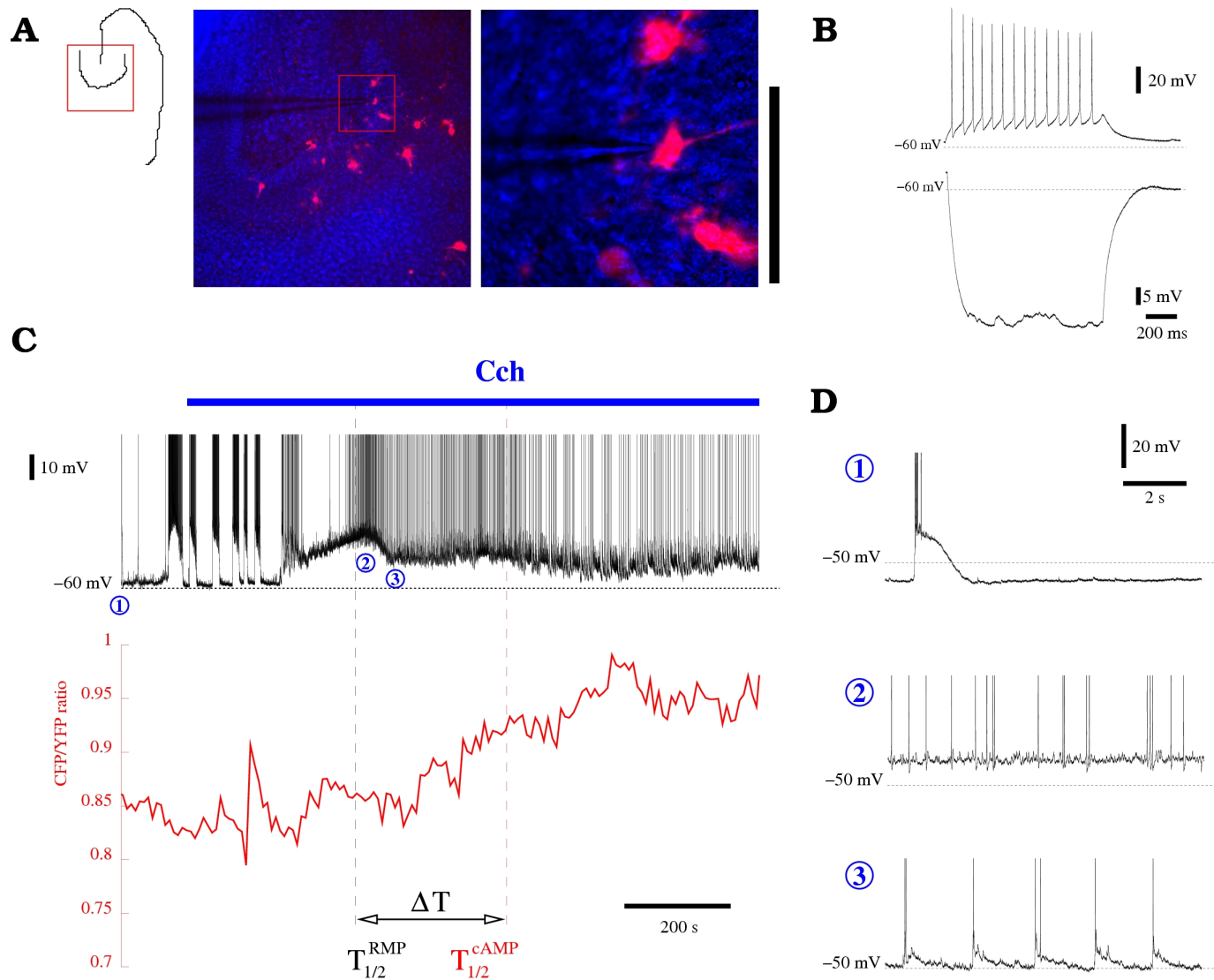


Fig. 7.5: CFP/YFP ratio from cAMP sensor increase with activation of cAMP production in a DG granule cell

Legend : **Figure 7.5 :** CFP/YFP ratio from cAMP sensor increase with activation of cAMP production in a DG granule cell A) A transfected cell is patched simultaneously with FRET measurement in Dentate Gyrus (assumedly a granule cell, central cell, the tip of the micropipette is visible). Superposition of transmitted light (blue) and YFP fluorescence (red) (scale barre : 100 μm)

B) Response of the same neuron to positive (+30 pA, top) and negative (-70 pA) square current pulses. No sag happens in this case, Spike are quite broad ($\leq 3ms$) and asymmetric.

C) Whole cell current clamp recording (top) and CFP/YFP ratio measurement of the same cell during application of carbachol (50 μM). Increase of $[cAMP]_i$ happens later as increase of RMP ($\Delta T \approx 200s$; both $T_{1/2}$ are computed as in Figure.7.4-D).

D) Details of membrane potential activity. (1) Control conditions : up/down like spontaneous activity; (2) Action of carbachol : depolarisation of RMP and increase of synaptic activity; (3) Synchronisation : Synchronised PPS happen approximately every second.

Transient $[cAMP]_i$ increases after spontaneous synaptic activity

Carbachol-induced oscillations produce an elevation of $[cAMP]_i$. In order to determine whether the variations in $[cAMP]_i$ results from direct action of muscarinic receptors or from synaptic activity, we analysed the possible change in $[cAMP]_i$ during spontaneous network activities.

Transient increases of $[cAMP]_i$ were observed in several cases after episodes of intense spontaneous synaptic activity (See tab.7.2). Figure.7.6 shows an increase of $[cAMP]_i$ in response to spontaneous synaptic activity. Increase of $[cAMP]_i$ also occurred during periodic spontaneous θ -oscillations (Figure.7.7). The amplitude of the transient CFP/YFP ratio increases corresponds to $42 \pm 23\%$ ($n = 4$) of the maximal increase after application of carbachol. Thus synchronised synaptic activities seem to initiate more production of cAMP than asynchronised synaptic activities.

Synaptic activity in hippocampal network induced production of cAMP in several cells. Thus, elevation of $[cAMP]_i$ after carbachol-induced θ -oscillations is probably not the direct consequence of muscarinic oscillations but the consequence of the increase of synaptic activity.

Name	Area	description of synaptic activity	Amplitude (%)
24C1 ¹	CA3	two bursts of disorganised synaptic activity	50
25C1	CA1	periodic synchronous synaptic activities	67
25C2	CA1	two bursts of disorganised synaptic activity	11
25C3 ²	CA3	periodic θ -oscillations	40
26C1 ³	CA3	periodic θ -oscillations	NC
26C2 ⁴	CA3	periodic θ -oscillations	NS
29C2 ⁵	CA1	periodic synchronous synaptic activity	NO

Tab. 7.2: Increase of $[cAMP]_i$ in response to spontaneous synaptic activity

List of experiment where spontaneous synaptic activity was observed. The amplitude is the proportion of CFP/YFP ratio increase normalised to maximal increase after application of carbachol. NC : "no-comparison", CFP/YFP ratio variations happen during synaptic activities, but no carbachol was added after, no maximal state of CFP/YFP ratio was measured to compare with spontaneous variations; NS : "no significant" variations of CFP/YFP; NO : "no observation" of CFP/YFP ratio, only electrophysiological record was done. 1 : presented in Figure 7.6; 2 : Figure 7.7; 3 : Figure 7.9; 4 : Figure 7.8-B & Figure 7.10; 5 : Figure 7.8-A;

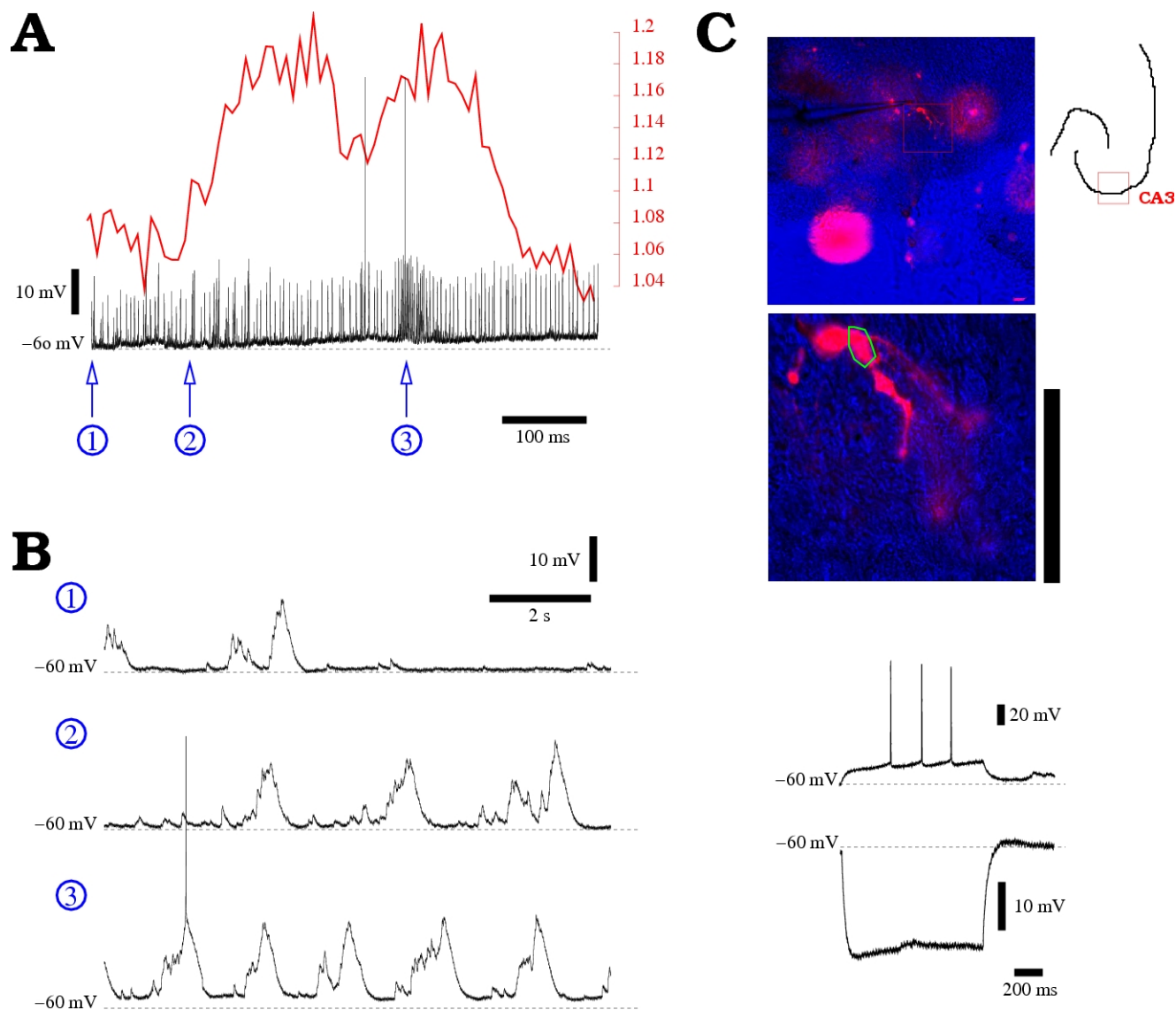


Fig. 7.6: Production of cAMP occurs during spontaneous synchronous synaptic activity

Legend : Figure 7.6 : Production of cAMP occurs during spontaneous synchronous synaptic activity

A) transient increase of cAMP after spontaneous synchronous synaptic activity.

B) (1) control activity ; (2) first spontaneous synaptic activity ; (3) second synaptic activity.

C) Top : Localisation of transfected cell in CA3 stratum pyramidale. Patched cell on the tip of the (broken) micropipette in small magnification photo. Bottom : Response to positive (+30 pA, top) and negative (-70 pA) square current pulses. Note sag.

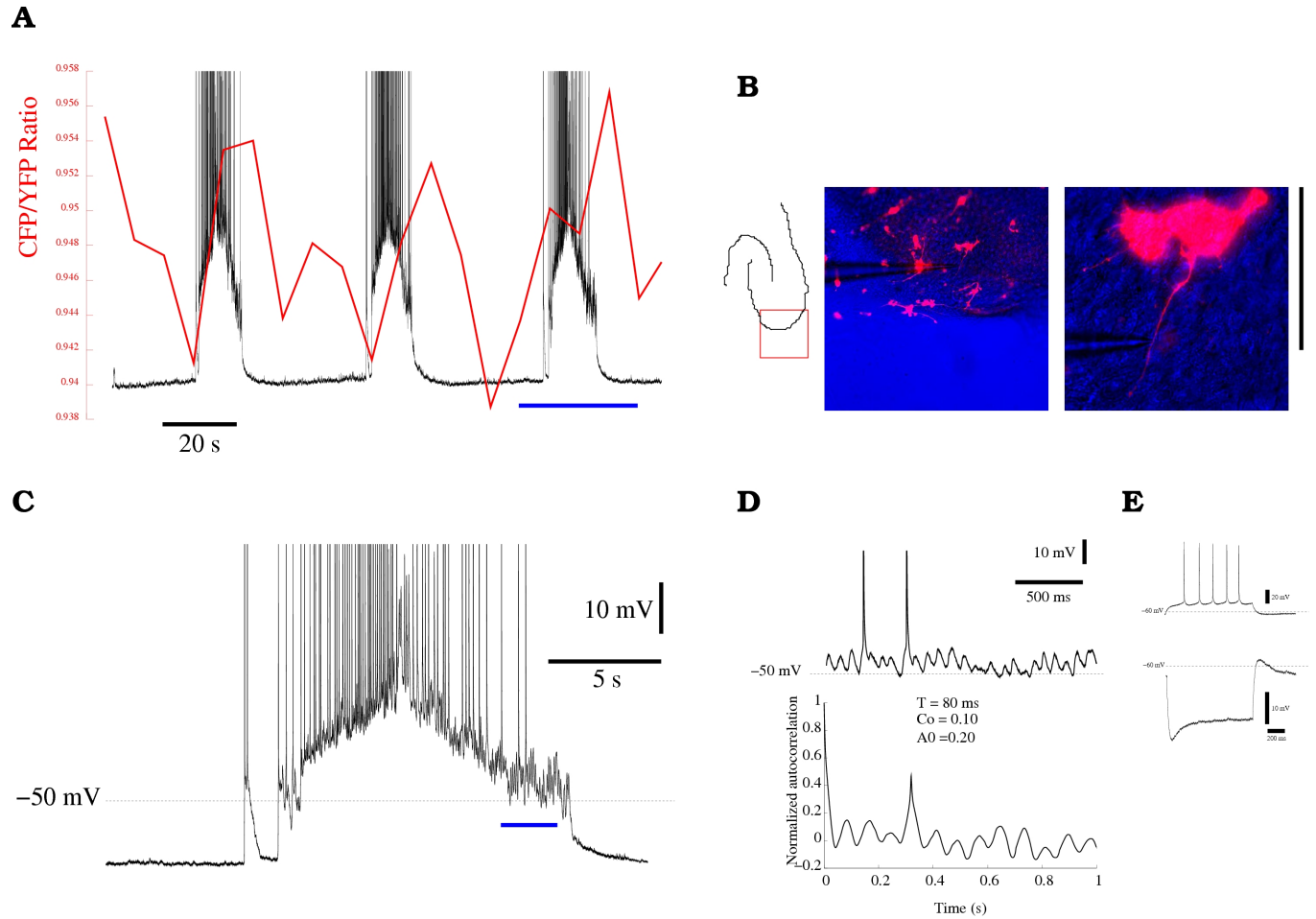


Fig. 7.7: Production of cAMP occurs during spontaneous theta oscillations

Legend : Figure 7.7 : Production of cAMP occurs during spontaneous theta oscillations

A) spontaneous theta oscillations occur regularly. cAMP increase in phase oscillatory episodes.

B) Localisation of transfected cell and patched cell (extremity of the micropipette) in CA3 *stratum pyramidale* (scale barre : 100 μm in larger magnification picture).

C) Detail of a spontaneous θ -oscillation corresponding to blue barre in A).

D) Characterisation of oscillations : top : 2 seconds long oscillations (corresponding to blue barre in C) ; bottom : corresponding autocorrelation. Firsts six intervals between maxima and minima determine the coefficient of oscillations (Co ; e.g. the regularity). Amplitude between first maximum and first both minima determine amplitude of oscillations (Ao ; e.g. the synchronisation). The period (T) is the mean of the first six intervals.

E) Response to positive (+40 pA, top) and negative (-100 pA) square current pulses.
Note sag.

I_H may be accelerated after oscillatory episodes

I_H is modulated by cAMP [Wainger et al., 2001]. With higher $[cAMP]_i$ I_H is activated at less hyperpolarised membrane potential and its kinetics is faster. The increase of $[cAMP]_i$ can increase the I_H conductance at relative depolarised membrane potential.

In order to test whether synaptic activity in the network could regulate I_H with a change in $[cAMP]_i$, we injected negative square current pulses every 8 s during current clamp recordings where spontaneous oscillations happened. The hyperpolarisation in response to negative current was systematically lower shortly after oscillatory episodes than before (Figure.7.8-A). The final equilibrium potential is however the same. The amplitude of the "sag" (V_{sag}), (between the maximum of hyperpolarisation and the final equilibrium potential) decreases ($-34 \% \pm 16 \%$; $n = 3$ cells) (Figure.7.8-B,C). This observation is compatible with an earlier and faster activation of I_H during the hyperpolarisation.

After blockade of I_H with ZD7288, the response of a negative square current do not change before and after oscillatory episodes ($n = 1$) (Figure.7.10-B). Thus, the observed changes seem to depend on I_H .

Even if these results need to be confirm with voltage-clamp recordings, they suggest that spontaneous oscillations accelerate the gating of I_H . The maximal conductance of I_H seem to be constant. The acceleration of I_H could be caused by the higher $[cAMP]_i$ after oscillations.

Legend : Figure 7.8 : I_H is accelerated after bursts of spontaneous θ -oscillations

A) Change of I_H -current after occurrence of spontaneous θ -episode. Response to negative square current pulses (-50 pA, 1 s) every 8 s before and after occurrence of θ -oscillations (Left) ; Comparison of first 200 ms before θ -oscillations (black) and after θ -oscillations at different delays (blue, green, red).

B) Comparison of response to negative square current before (more than 30 s after a prior θ -episode, in blue) and after (less than 5 s after a prior θ -episode, in black) in control conditions (left) and after blockade of I_H -current with 1 μM ZD7288 (right) ; other cell, square current pulses : -150 pA in control, -50 pA with ZD7288 ; 1 s.

C) Comparison of amplitude of V_{sag} before (more than 30 s after a prior θ -episode, in blue left) and after θ -oscillations (less than 5 s after a prior θ -episode, in black right) ; $n=3$; $p \leq 0.01$ test Wilcox's. Values normalised at values after θ -oscillations.

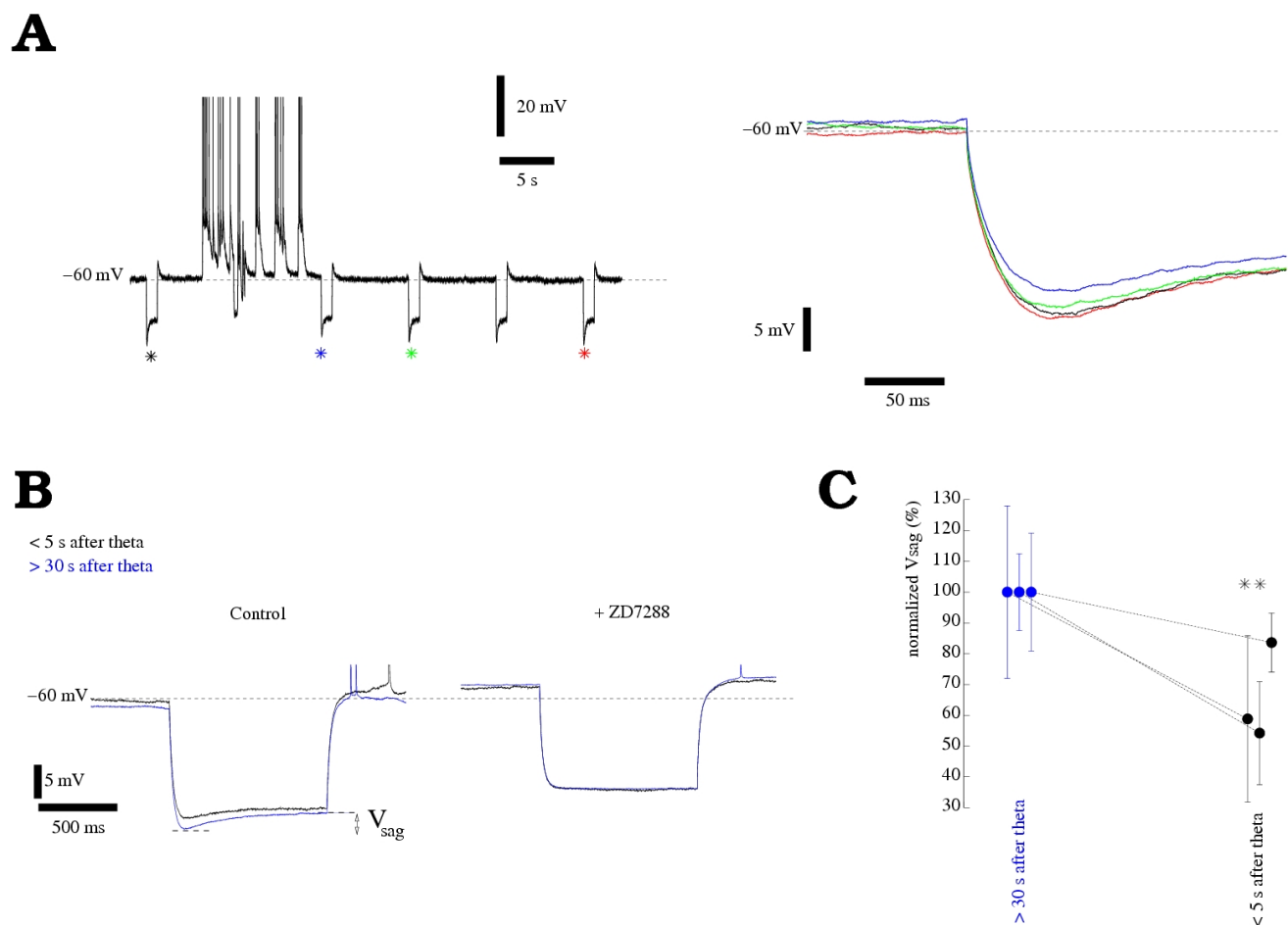


Fig. 7.8: I_H changes after bursts of spontaneous θ -oscillations

Spontaneous θ -oscillations are more synchronised at the end than at the beginning of oscillatory episodes

In our previous work, we show that I_H locks *in vitro* θ -oscillations in hippocampus [Gastrein et al., 2007]. We determined whether the elevation of $[cAMP]_i$, which could up-regulates I_H , changes the properties of oscillations.

The patterns of oscillations become systematically more regular, more synchronised and the period slower at the end of oscillatory episodes (Figure 7.9). Oscillations reflect synchronised network activity. The autocorrelogramms show how regular and how synchronised are the oscillations. The coefficient of oscillation (Co) is the ratio between the standard deviation and the mean of the peaks intervals. It evaluates the regularity of the oscillations. Lower is the value of Co, better is the regularity. The Co decreases systematically between the beginning and the end of the oscillations (from 0.220 ± 0.104 to 0.118 ± 0.053 , $p \leq 0.0001$, Wilcoxon's paired test, 3 cells, 52 oscillatory episodes). The Ao is the amplitude between the first minimum and the first both maxima of the autocorrelogramm. Higher is the Ao, better is the synchronisation of the inputs. Ao increases between the beginning and the end of the oscillations (from 0.189 ± 0.380 to 0.380 ± 0.160 , $p \leq 0.0001$). The period of the oscillation increase also between the beginning and the end of the oscillations (from 114 ± 37 ms to 210 ± 68 ms, $p \leq 0.0001$).

The quality of the oscillations change between the beginning and the end of the oscillatory episodes. The regularity, the synchronisation and the period increase. We can hypothesise that these qualitative changes of the oscillations are correlated with the transient increase of $[cAMP]_i$.

Legend : Figure 7.9 : End of spontaneous θ -oscillations are more synchronised as beginning of θ oscillation

A) Production of cAMP in phase with spontaneous periodic θ -oscillations. Negative square current pulses were injected each 8 seconds.

B) Details (top) and corresponding autocorrelogramms (bottom) of oscillations at the beginning (1) and at the end (2) of oscillations, 2 s sample. The amplitude of oscillations (Ao) and the period (T) are bigger and the coefficient of oscillations (Co) is smaller at the end of oscillations as at beginning.

C) Quantification at the beginning (left) and at the end (right) on each spontaneous θ -oscillation during a record (Top; black dots, 36 episodes) and mean (red, with standard deviation) of coefficients of oscillation (Co, evaluates the regularity; see method) (left) which decrease at the end of the oscillation (e.g. better regularity); and of amplitudes of

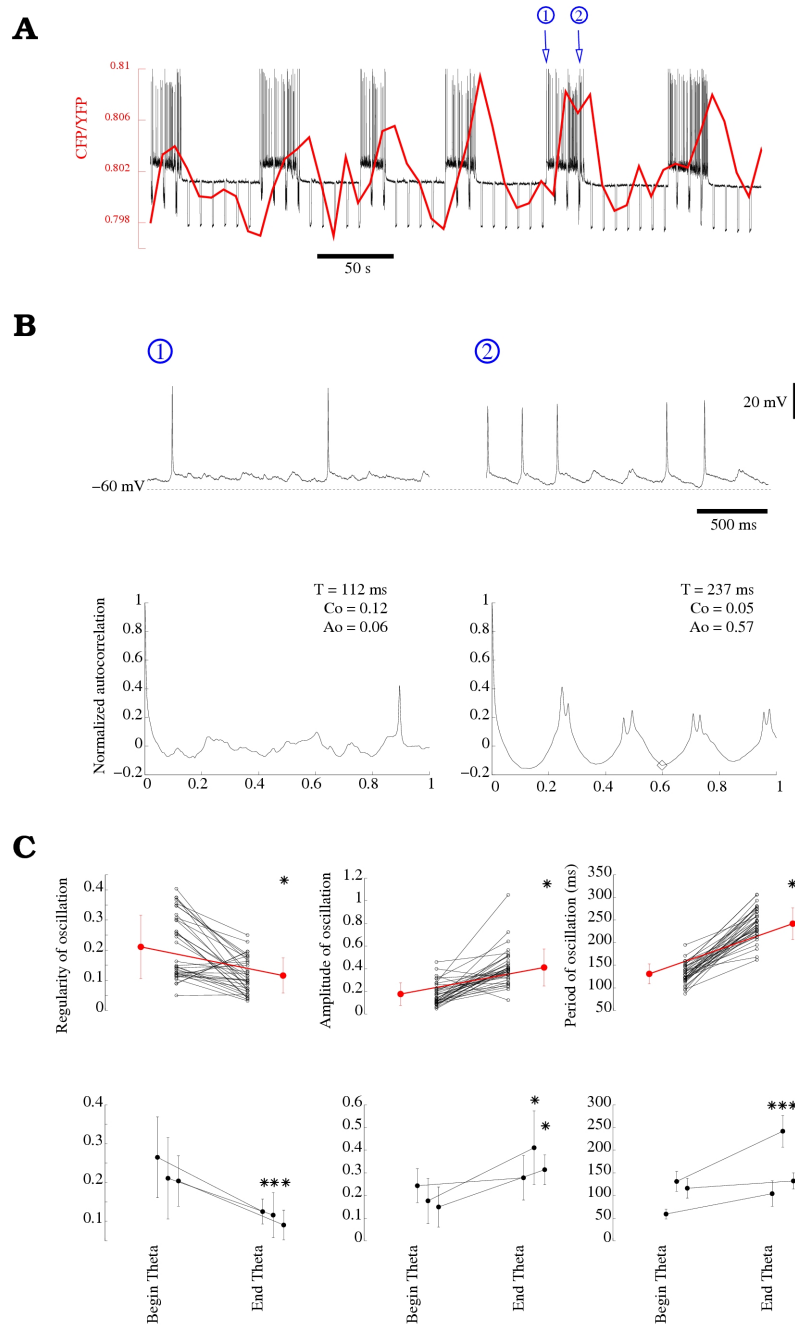


Fig. 7.9: End of spontaneous θ -oscillations are more synchronised as begin of θ oscillation

oscillation (Ao, evaluates the synchronisation ; see method) (middle) which increase at the end of the oscillations (e.g. better synchronisation). The period of oscillations increases at the end of oscillations (right) Bottom : quantification on several cells (n=3 ; Wilcox's paired test : * $p \leq 0.01$).

Does blockade of I_H suppress the changes in oscillations quality ?

The changes in synchronisation, regularity and period of oscillations between the beginning and the end of oscillations are probably caused by a cAMP-modulated up-regulation of I_H .

After blockade of I_H the change in quality of oscillations during oscillatory episodes disappeared (n=1) (Figure.7.10). The Co do not decrease, the Ao do not increase and the period do not significantly change. As observed *in vitro* in our previous work, the θ -episodes seem to be longer after blockade of I_H (from 9.5 ± 3.1 s - 5 episodes - to 20.5 ± 8.9 s - 20 episodes -, $p = 0.002$, 1 cell). The qualitative amelioration of oscillations at the end of oscillatory episodes are caused by modulation of I_H current.

Legend : Figure 7.10 : Change in regularity, synchronisation and period during oscillations disappears after blockade of I_H -current

In control oscillations become more regular, more synchronised and slower at the end compare to the beginning of oscillations. After blockade of I_H change in oscillations disappears.

A) Spontaneous θ -oscillations in control condition (left) and after blockade of I_H ($1 \mu M$, left).

B) Autocorrelogramms of oscillations in 1,2,3 & 4 in A). Top : control conditions ; bottom : + $1 \mu M$ ZD7288 ; left : beginning of θ -oscillations ; right : end of θ -oscillations.

C) Quantification of the synchronisation (top), the regularity (middle) and the period (bottom) of spontaneous θ -oscillations in control conditions (black, 5 episodes) and after blockade of I_H (red, 20 episodes) at the beginning (left) and at the end of oscillations (right). Statistical difference for Co and Ao in control conditions ($p \leq 0.05$, Wilcoxon's paired test) ; no significant difference for period in control conditions and for all parameters with ZD7288 ; 1 cell.

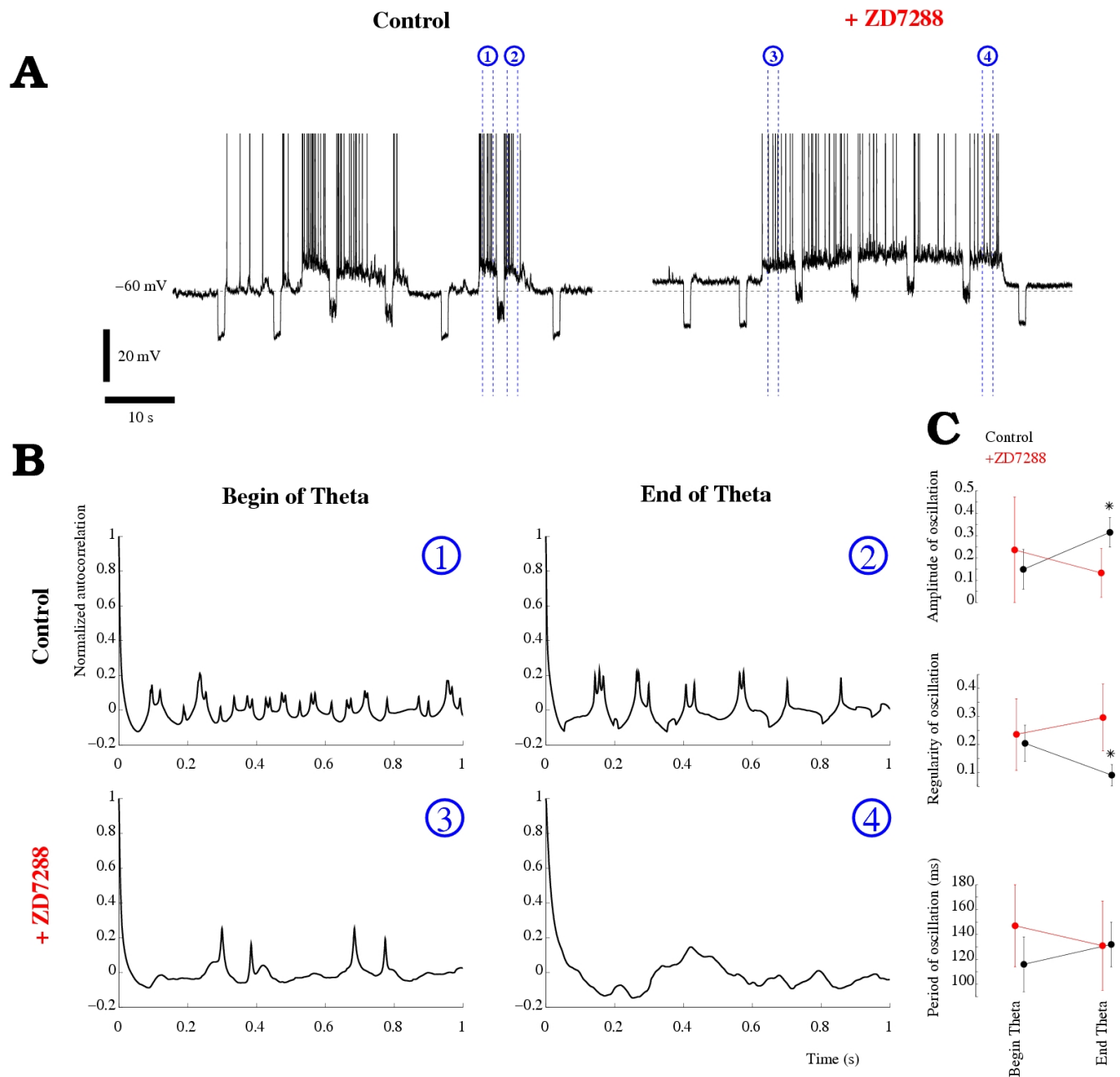


Fig. 7.10: Change in regularity, synchronisation and period during oscillations disappears after blockade of I_H -current

7.3.3 Increase in $[cAMP]_i$ starts from periphery and spreads to soma

Synaptic activity concern first dendrites. The elevation of $[cAMP]_i$ is induced by synaptic activity. We can thus expect localised production of cAMP. Furthermore different configurations of cAMP behaviour in cytosol are known. In frog olfactory cilia, cAMP freely diffuse [Chen et al., 1999]. In contrast, in neonatal cardiac myocytes cAMP production is compartmentalised in discrete microdomaine [Zaccolo and Pozzan, 2002]. We analysed the spatial organisation of the variations of $[cAMP]_i$ to determine the behaviour of cAMP in cytosol of hippocampal cells.

In several cases, we could follow the spread of the elevation of $[cAMP]_i$ from peripheral parts of one cell to its soma (Fig.7.11). The spreading velocity of $[cAMP]_i$ increase was $1.1 \pm 0.8 \mu m/s$ (See Tab.7.3; 11 cells, 18 distances of spread). The spreading velocities were not constant. They can be faster in some cells than in other ones (cell "24C2" : $0.65 \mu m/s$ and cell "25C1" : $3.1 \mu m/s$ for example). Furthermore spreading velocity can be faster in a subcellular compartment than in another one (from $1.2 \mu m/s$ to $0.7 \mu m/s$ inside cell "08C1" for example).

If we consider the diameter of cells around $1 \mu m$, we can conclude a diffusion coefficient of $1.1 \pm 0.8 \mu m^2/s$. This velocity is slower than the diffusion coefficient of cAMP in aqueous solution near physiological ionic strength is $\approx 400 \mu m^2/s$ [Bowen and Martin,].

In hippocampal cells the cAMP can spread but that diffusion is retarded by some buffering mechanisms or diffusion barriers (compartmentalisation), like suggested by in literature [Rich et al., 2000][Karpen and Rich, 2001][Barnes et al., 2005]. Or there may be a slow propagating activation of *in situ* cAMP production.

Legend : Figure 7.11 : cAMP production after carbachol-induced θ -oscillations begins in dendrite and spreads to soma

A) localisation of a cAMP-sensor-transfected cell in CA1 *stratum radiatum*. (scale barre : $50 \mu m$) labelled area 1, 2 & 3 with blue lines. Distances between areas are taken from barycentre of each area.

B) The increase of $[cAMP]_i$ occur successively in area 3, in area 2 and area 1. Normalised CFP/YFP ratio of area 1 (black), 2 (blue) & 3 (red), measurements each 8 s, normalisation between begin and end of recordings; fits with Boltzmann function determine half-time of increases. Time shifts between areas are subtraction of half times.

Name	Area	v ($\mu m/s$)
OrgC9	CA4	1.1
OrgC10	CA1	0.8
OrgC11	DG	1 2
OrgC12a	subiculum	2.3 2.5
OrgC12b		0.4
08C1*	CA1	0.7 1.2
24C1	CA3	0.4
24C2	DG	0.65
24C3a	CA1	0.5 0.5
25C1	CA1	3.1 0.9
25C2	CA1	0.7 1.3 0.3

Tab. 7.3: Spreading velocities of cAMP elevation

Spreading velocities were computed from the ratio between a distance and a time delay, where the distance is the distance between two selected areas and the time delay is a delay between the two half-times of $[cAMP]_i$ increase in these areas. Several spreading velocities can be determined for one cell. * in Fig.7.11 given example .

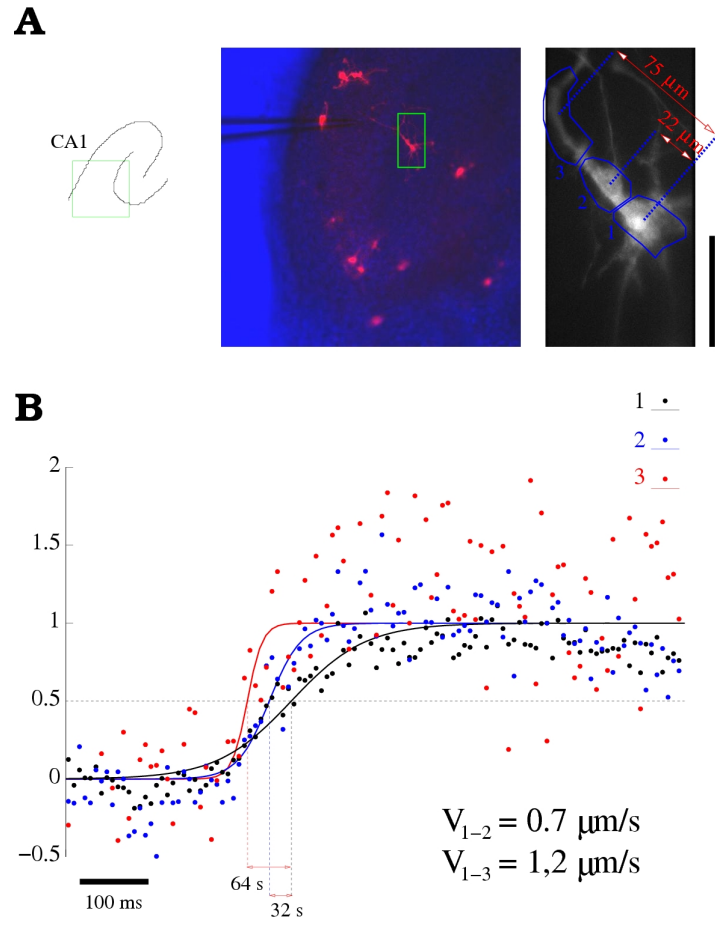


Fig. 7.11: cAMP production after carbachol-induced θ -oscillations starts in periphery and spreads to soma

7.4 Discussion

In this work, we combined electrophysiological recordings and FRET-based measurements of $[cAMP]_i$ time-dependent variations in murine organotypic hippocampal cultures. It is the first time that $[cAMP]_i$ variations during neuronal network activation are monitored.

We reported two main issues. First, carbachol-induced or spontaneous synaptic activity induced an elevation of $[cAMP]_i$. The increase of $[cAMP]_i$ during oscillatory episodes may up-regulate I_H in CA1 and CA3 pyramidal cells. The synchronisation, the regularity and the period of oscillation increase at the end of oscillatory episodes. We hypothesise that the cAMP-induced up-regulation of I_H is the cause of these changes in oscillations. Second, spatial analysis shows that the elevation of $[cAMP]_i$ starts from periphery and spreads to the soma. The spreading velocities were slower than free diffusion.

7.4.1 Variations of $[cAMP]_i$ during network activity in the hippocampus

Network activity in hippocampal cultures induces cAMP production

$[cAMP]_i$ increased after synaptic activity. We observed three configurations of network synaptic activities: carbachol-induced oscillations, spontaneous disorganised synaptic activities and periodic spontaneous θ -oscillations. In the three cases, cAMP production followed synaptic activity.

Carbachol-induced oscillations were reproducible in each culture. Depolarisation of cells in the network led to more synaptic activity, and often to synchronous θ -oscillations.

Several arguments support the hypothesis that cAMP production after carbachol-induced oscillations are the consequence of the carbachol-induced synaptic activity rather than the direct consequence of activation of muscarinic receptors. First, transient elevations of $[cAMP]_i$ occurred also during spontaneous synaptic activity. Second cAMP production occurred within a steady (around 5 minutes) delay after carbachol-induced membrane depolarisation. If carbachol induced directly cAMP production, this delay would be shorter. Third the literature does not report activation of cAMP production by activation of muscarinic receptors in the hippocampus. The muscarinic receptors which are identified in *stratum oriens* interneurons (M1/M3) do not activate cAMP production [Lawrence et al., 2006c]. Modulation of I_H can be used in order to follow variations of $[cAMP]_i$ [Bickmeyer et al., 2002] and muscarinic agonist does not modulate I_H in CA1

pyramidal neuron [Halliwell and Adams, 1982].

Modulation of I_H and regulation of oscillations

The oscillations became more regular, more synchronised and slower towards the end of oscillatory episodes when $[cAMP]_i$ was elevated. We speculate that these phenomena were correlated. cAMP can modulate hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-modulated current (HCN or I_H). It shifts I_H activation curve to more depolarised values and accelerates its kinetics. In thalamocortical relay neurons, production of cAMP during oscillations modulates I_H which regulates the oscillations [Lüthi and McCormick, 1999]. Similar mechanisms could occur in the hippocampus. Our previous work shows that I_H determines the synchronisation of cortical θ oscillations. The more regular and more synchronised oscillations at the end of oscillatory episodes would be in agreement with larger and faster I_H . Indeed, membrane potential response to negative square current shortly after oscillatory episodes had a less deep sag without change in final equilibrium potential. Such response could correspond to an earlier and faster activated I_H current. Furthermore we show (only on 1 cell) that blockade of I_H suppresses the changes in oscillations during oscillatory episodes. To further confirm this point, we have to measure I_H properties with voltage pulses during voltage-clamp records in spontaneous oscillating cultures.

Spread of $[cAMP]_i$ from peripheral parts of cells to soma

The increases of $[cAMP]_i$ in hippocampus seem to be not compartmentalised like in neonatal cardiac myocytes [Zaccolo and Pozzan, 2002], but spreads from peripheral parts of cells to the soma. However the spreading velocity is smaller as a freely diffusion ($1.1\mu m^2/s$ vs $260\mu m^2/s$) [Chen et al., 1999]. Either spreading of cAMP follows a buffered diffusion or corresponds to a propagation of compartmentalised *in situ* cAMP production. The first mechanism would be cytosolic, the second would occur along the membrane and depend from membrane properties. In Fig.7.11, the velocity seems faster in extremity than in proximity on soma. Since the diameter of extremity is smaller than the diameter of the proximal part, we may conclude that the diffusion coefficient would be the same during the spreading. So the observed spreading should be the consequence of a buffered diffusion. But we report opposite examples where velocities in extremity seem slower as in proximal parts. We can alternatively propose a mechanism where the activation of cAMP production propagates from the periphery to the soma, possibly at subcellular compartment-dependent velocities. It is also very probable that there is large difference between cell type. To assess these questions, we have to better define the identity of transfected cells by electrophysiological records and immunological labelling, and also to

describe the 3D-geometry, because we need exactly to know the diameter of each part, and the real distance between compartments (until yet we considered 2D distances and we may loose distances in deepness). We have to fix the cultures after record and analyse the 3D-structure in confocal microscope.

7.4.2 Methodology

Evaluation of $[cAMP]_i$

Zaccolo et al. developed several cAMP sensors. They first used the cAMP-dependend protein kinase (PKA). PKA is composed of two subunits, the regulatory subunit RII and the catalytic subunit C. In absence of cAMP, both subunits oligomerise and the complex is inactive. In presence of cAMP, the C subunits separate themself from RII subunit. The catalytic domain becomes free. The PKA-based cAMP sensor use this oligomerisation. CFP is fused to the C subunit, and YFP to RII. FRET occurs in absence of cAMP when both subunits are oligomerised, and decreases as $[cAMP]_i$ increases [Zaccolo et al., 2000][Zaccolo and Pozzan, 2002].

A second FRET-based cAMP sensor was later developed using exchange protein directly activated by cAMP (Epac1) which is assumed to be folded in the absence of cAMP and unfolded in the presence of cAMP [Ponsioen et al., 2004]. The Epac-cAMP sensor exhibits an extended dynamic range of sensitivity as compared with the PKA-cAMP sensor [Zaccolo et al., 2005].

The present study provides only relative variations of CFP/YFP ratio which corresponds to variations of $[cAMP]_i$ because recording with only one excitation wavelength and two emission wavelengths did not allow to determine absolute value of $[cAMP]_i$. After carbachol-induced activity, the CFP/YFP ratio reaches a plateau value. Either $[cAMP]_i$ stabilised or reached the limit of cAMP-sensor sensitivity. Peter Salonikidis and André Zeug determine that the dynamic range of CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP sensitivity is from 10 nM to 100 μ M with a $K_{\frac{1}{2}} = 1\mu M$ (personal communications, results submitted...). If the plateau of CFP/YFP ratio corresponded to a overstepping of cAMP sensor sensitivity, we would have a indirect way to evaluate quantitatively $[cAMP]_i$. In between Peter Salonikidis and André Zeug developed a method using two recording wavelength which is able to determine the absolute $[cAMP]_i$. Our results could be quantitatively reproduced with this new method.

Spontaneous θ oscillations in hippocampal culture

We observed spontaneous θ oscillations in one set of cultures. This behaviour was not described until yet in isolated hippocampal cultures. This set of culture looked like however safety. This observation needs to be reproduced in a new set of culture to be validated. cAMP production occur also during these spontaneous oscillatory episodes.

Identification of cells

Generally electrophysiological recordings were obtained from a non-transfected neuron. Transfected cells was identified only by their localisation in the slice and their morphology (Tab.7.1). We selected cells with polarised a morphology. In only one case we measure in whole-cell the transfected cell during application of carbachol (a granule cell, Fig.7.5). In other cases we performed a whole-cell patch-clamp recording on a cell other than the transfected one in order to avoid a washout of the cAMP-sensor.

7.4.3 Outlooks

Origin of cAMP production

The facts that cAMP production follows synaptic activity and begins in some peripheral parts of cells let us hypothesise that these parts are dendritic, or at least close to synapses.

Activation of NMDAR increases the quantity of cAMP in the hippocampus [Chetkovich and Sweatt, 1993][Vanhoose and Winder, 2003]. In the hippocampus, glutamatergic synapses contains NMDAR. The role of NMDAR in synaptic plasticity is already well-known. Ca^{2+} -induced cAMP production is necessary for LTP between mossy fiber and CA1 pyramidal cells [Wong et al., 1999]. NMDAR are also important for generation of hippocampal θ oscillations [Gillies et al., 2002][Orban et al., 2006]. All these converging facts let us hypothesise that synaptic-induced cAMP production in hippocampus is due to Ca^{2+} influx through NMDAR. To assess this point, it would be necessary to block NMDAR with the antagonist APV during carbachol application or in spontaneous oscillating cultures. No information exists also about the exact localisation of the NMDAR-induced cAMP production in the hippocampus. One can expect a production in pyramidal cells, especially in dendrites. Bath application of NMDA on CFP-Epac1-YFP transfected cells would allow to assess this question.

Muscarinic agonist induces an increase of cell excitability. These change of intrinsic cell

properties could be the cause of cAMP production. In order to determine if a cAMP increase is intrinsic or synaptic, variations $[cAMP]_i$ should be followed in cells where excitability is increased by a high extracellular potassium and where synaptic activity is pharmacologically blocked.

It is known that cAMP quantity increases also after activation of β_1 -adrenergic receptors [Vanhoose and Winder, 2003]. We plan to block these receptors to assess their role in synaptic activity induced cAMP production.

β_1 -adrenergic- and NMDAR-induced increases in cAMP in CA1 are potentialised by activation of α -adrenergic receptors and depressed by activation of $GABA_B$ -receptors, D_2 -dopamine receptors and $5HT_{1A}$ -serotonin receptors [Vanhoose et al., 2004]. It is surprising that these four G-protein coupled receptors (GPCR) have opposite effect on cAMP production. These contradictory effects could happen at the same time in different cell types of different subcellular compartments. Monitoring variations of $[cAMP]_i$ in CFP-Epac1-YFP transfected during activation of these different receptors will help to better understand the respective role of these receptors.

I_H , a tuner of oscillations ?

I_H kinetics is modulated on different times scale. (i) Very fast through the direct binding of cAMP which accelerates I_H and shift the activation curve to more depolarised voltage [Wainger et al., 2001], PIP2 seems to act similarly [Zolles et al., 2006][Pian et al., 2006]. (ii) At short term, in some case phosphorylation can occur [Zong et al., 2005][Arinsburg et al., 2006] and several proteins can interact with HCN proteins and act as beta-subunit (like MiRP2) [Proenza et al., 2002] or regulate the trafficking and the density of HCN at the membrane [Santoro et al., 2004][Gravante et al., 2004][Kimura et al., 2004]. (iii) The regulation of expression can at long term change the ratio between HCN isoforms [Brewster et al., 2002].; homomeric HCN1 channels conduct fast and less cAMP-sensitive I_H , homomeric HCN2 channels conduct slow and more cAMP-sensitive I_H . Heteromeric HCN1/HCN2 channels conduct I_H which presents intermediate properties [Chen et al., 2001b]. During the development, molecular switch from HCN2 to HCN1 occurs in the CA1 area [Brewster et al., 2006]. The ratio HCN2/HCN1 increases in a model of febrile seizure-induced epilepsy [Brewster et al., 2002]. Such a long term increase of I_H conductance lead to a hyperexcitability in response to inhibition in the hippocampus.

As already mentioned, cAMP production in thalamocortical relay neurons regulates oscillations. In our study, we hypothesise that a short-term modulation of I_H could regulate

oscillations in the hippocampus in a analog manner like in thalamocortical neurons. The molecular diversity and the number of modulation way of I_H current let us assume that this intrinsic membrane ionic current is a privileged target for plasticity, especially for plasticity of temporal membrane properties, like a tuner. The membrane properties of each neuron has repercussion on network through the coupling capacity between cells.

In CA1 pyramidal cells, the cAMP sensitivity to cAMP decreases after the 4th week. Because the measured culture correspond to P15 to P20 mice, they would be before this switch of the 4th week. We can expect that in older cells cAMP production during oscillations will less influence the oscillations. Maybe others mechanisms appear or the network is mature enough that there is no need for an adapting mechanism in every oscillation.

Acknowledgement We thank Dr. Kees Jalink from the Department of Cellular Biophysics, The Netherlands Cancer Institute, who kindly provided us with cDNA encoding for the CFP-Epac-YFP fusion construct. We thank Dr. Dominique Debanne and Fritz Kobe for critically reading the manuscript.

Troisième partie

Discussion

Chapitre 8

Rôles du courant I_H dans la synchronisation et la régularité des oscillations θ dans les structures corticales

8.1 Le courant I_H n'est pas nécessaire pour l'apparition d'oscillations θ mais améliore leur régularité à travers l'organisation temporelle des caractéristiques de réponse des neurones à l'activité de réseau

8.1.1 Le blocage du courant I_H diminue la régularité et la synchronisation des oscillations θ *in vitro*

Le blocage du courant I_H avec une concentration modérée de ZD7288 ne fait pas disparaître les oscillations θ induites par l'activation des récepteurs muscariniques *in vitro*, ni dans le néocortex, ni dans l'hippocampe. Néanmoins, en comparant les autocorélogrammes des oscillations en contrôle et après blocage de I_H , on observe une désorganisation du rythme θ , aussi bien lorsqu'il est mesuré au niveau du réseau par le potentiel de champ que lorsqu'il est mesuré au niveau cellulaire en patch-clamp mode cellule entière. La régularité, évaluée par le coefficient d'oscillation, et la synchronisation,

évaluée par l'amplitude d'oscillation, sont dégradées après blocage du courant I_H .

8.1.2 Mécanismes par lesquels I_H améliore la régularité et la synchronisation

Nous avons repéré quatre mécanismes dans lesquels le courant I_H joue un rôle et qui sont probablement critique pour la régularité et la synchronisation de l'activité rythmique de réseau.

a) Régularité de décharge dans les interneurones O/A

Les interneurones entre *stratum oriens* et *alveus* (O/A) ont déjà été identifiés comme des générateurs de rythme potentiel [Maccaferri and McBain, 1996]. Ils déchargent de manière spontanée à des fréquences θ de manière dépendante de I_H [Gillies et al., 2002] et présentent une fréquence de résonance proche des fréquences θ [Pike et al., 2000]. Nous montrons que dans les interneurones O/A, le courant I_H détermine essentiellement la régularité de décharge spontanée. En effet le blocage du courant I_H diminue la précision à laquelle a lieu la décharge consécutive. La précision de décharge est définie par la pente de redépolarisation de la posthyperpolarisation (AHP, pour *afterhyperpolarisation*). Or celle-ci est plus lente après blocage de I_H .

b) Fréquence de résonance dans toutes les cellules du réseau

Le courant I_H détermine une fréquence de résonance des neurones néocorticaux [Hutcheon et al., 1996b], notamment dans les cellules pyramidales de la couche 5 [Ulrich, 2002] et de la région CA1 [Hu et al., 2002]. Nous montrons que la fréquence de résonance observée dans les interneurones O/A dépend aussi du courant I_H . Ainsi, la plupart des cellules impliquées dans l'activité de réseau oscillante partage des fréquences de résonance aux mêmes fréquences. Chacune filtre préférentiellement des signaux d'entrée arrivant à des fréquences θ .

c) Couplage I-S

Il a été observé que la génération d'un PPSI dans un neurone proche du seuil de décharge synchronise le déclenchement des PA consécutifs [Cobb et al., 1995]. Nous montrons que le courant I_H est nécessaire pour maintenir une bonne précision dans le couplage entre PPSI et décharge en rebond dans les cellules pyramidales de la région CA1. Le courant I_H

est activé par l'hyperpolarisation. Il accélère donc la repolarisation du PPSI. Il peut même produire une légère dépolarisation en rebond. Cette pente de dépolarisation consécutive au PPSI définit une précision fidèle de la décharge. On observe dans les cellules pyramidales de CA1 pendant les oscillations θ des trains de PPSI intercalés entre les PA. Comme les interneurons identifiés comme étant générateurs du rythme établissent surtout des synapses GABAergiques avec les cellules pyramidales [Klausberger et al., 2003], cette propriété est essentielle pour que le barrage inhibiteur induise des décharges synchronisées en sortie.

d) Couplage E-S

Les oscillations θ commencent à se mettre en place par une forte activité synaptique GABAergique. Mais les cellules pyramidales projettent des synapses glutamatergiques en boucle rétroactive sur les interneurons ou vers d'autres régions (par exemple entre CA3 et CA1). La précision de la décharge en réponse à un PPSE est donc tout autant critique. La dépolarisation causée par un PPSE désactive le courant I_H du potentiel de repos. La diminution du courant entrant résultante accélère le décours temporel du PPSE [Magee, 1998]. Or le temps pendant lequel un PPSE reste dépolarisé est critique pour la précision de la latence de décharge qu'il peut déclencher [Fricker and Miles, 2000]. Nous montrons que le blocage du courant I_H diminue la précision du couplage entre PPSE et décharge. On retrouve là la règle de Fricker et Miles selon laquelle la succession d'un courant entrant puis d'un courant sortant définit la précision du couplage E-S. Ici le courant I_H génère un courant virtuellement sortant en étant désactivé.

8.2 La variation de la concentration en AMPc intracellulaire pendant les oscillations θ peut participer à leur régulation en modulant le courant I_H

Dans la première partie de notre étude, nous montrons que le courant I_H détermine la régularité et la synchronisation des oscillations θ en améliorant la précision de plusieurs opérations de l'activité rythmique de réseau dans une fenêtre temporelle correspondant à sa cinétique d'activation et de désactivation. On peut s'attendre à ce qu'une modification de la cinétique du courant I_H dans les cellules du réseau ait une influence sur les caractéristiques des oscillations θ . L'AMPc est le principal modulateur connu du courant

I_H [Wainger et al., 2001]. Or l'activation des récepteurs NMDA induit une augmentation de la quantité d'AMPC dans la région CA1 [Chetkovich et al., 1991].

8.2.1 L'activité synaptique provoque une augmentation de la concentration en AMPC intracellulaire

Augmentation de la $[AMPc]_i$ suite aux oscillations θ induite par le carbachol
Nous montrons que l'augmentation de l'activité de réseau consécutive à l'activation des récepteurs muscariniques induit une augmentation de la concentration en AMPC intracellulaire dans des cultures hippocampales. Il est peu probable que cette augmentation soit la conséquence directe de l'activation des récepteurs muscariniques, d'une part parce que les récepteurs muscariniques connus dans l'hippocampe n'activent pas la voie de signalisation de l'AMPC [Halliwell and Adams, 1982][Lawrence et al., 2006c], et d'autre part parce que l'augmentation de la concentration en AMPC intracellulaire a toujours lieu au moins 3 minutes après la dépolarisation causée par l'activation des récepteurs muscariniques.

Propagation de la production d'AMPC depuis les parties périphériques des cellules

L'augmentation de la $[AMPc]_i$ débute toujours dans les parties périphériques des cellules pour se répandre vers le soma. La vitesse de l'augmentation de la $[AMPc]_i$ est plus lente que la diffusion libre de l'AMPC. Cette propagation correspond soit à une diffusion ralentie par des propriétés tampons du cytosol comme l'hydrolyse par les PDE, soit à une propagation de proche en proche le long de la membrane de la production d'AMPC.

Augmentation de la production suite à une augmentation spontanée de l'activité synaptique

Nous avons aussi observé que l'augmentation spontanée de l'activité synaptique, soit désordonnée soit synchronisée à une fréquence θ induit une augmentation temporaire de la $[AMPc]_i$. L'amplitude de la variation de la $[AMPc]_i$ est inférieure, de moitié environ, aux variations observées suite à l'induction d'oscillations par ajout de carbachol.

8.2.2 Changements des oscillations θ et modulation du courant I_H pendant un épisode oscillatoire spontanée

Augmentation de la régularité, de la synchronisation et de la période des oscillations

La régularité et la synchronisation des oscillations θ sont toujours meilleures en fin d'épisode oscillatoire qu'en début. La fréquence diminue au cours des épisodes. Les deux phénomènes, amélioration qualitative des oscillations et augmentation de la $[AMPc]_i$, sont simultanée. Nous supposons qu'ils sont corrélés.

Effet de l'augmentation de la $[AMPc]_i$ sur le courant I_H

La réponse à un créneau hyperpolarisant en courant imposé se modifie après un épisode d'oscillations θ spontanées. L'hyperpolarisation maximale est moins forte et le potentiel de membrane atteint plus rapidement un potentiel d'équilibre. Cette observation pourrait correspondre à une accélération du courant I_H . Quand le courant I_H est bloqué, on n'observe pas de différence de résistance de membrane entre une réponse à un créneau de courant négatif générée avant et après un épisode oscillatoire.

La modulation du courant I_H serait la cause des changements qualitatifs des oscillations

Le blocage du courant I_H par ZD7288 rend les caractéristiques qualitatives des oscillations θ invariantes pendant un épisode oscillatoire. L'accélération du courant I_H après un épisode oscillatoire pourrait être due à l'augmentation de la $[AMPc]_i$. Le courant I_H serait aussi actif à des valeurs plus dépolarisées. Une conductance I_H plus forte et plus rapide dans les cellules activées par les oscillations θ favoriserait une meilleure synchronisation de ces oscillations.

8.2.3 Scénario hypothétique de l'interaction entre oscillations, AMPc et I_H dans l'hippocampe

Nous proposons le scénario suivant. L'activité synaptique intense pendant les oscillations θ active les récepteurs NMDA. L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire active la production d'AMPc. L'augmentation de la $[AMPc]_i$ accélère la cinétique du courant I_H et décale sa courbe d'activation vers des valeurs plus dépolarisées. Le courant

I_H , actif à des valeurs plus dépolarisées et plus rapide, agit plus sur la synchronisation et la régularité des oscillations θ . Il se pourrait même que le courant I_H facilite l'arrêt des oscillations en les amortissant. En effet, nous observons, aussi bien *in vitro* qu'en culture, que la durée des oscillations θ est plus longue après blocage du courant I_H .

Ces hypothèses demandent toutefois à être validées par plusieurs expériences complémentaires. Le blocage des récepteurs NMDA pendant des oscillations induites par carbachol ou spontanées devrait permettre de déterminer si la production d'AMPc est bien dépendante de l'activation des récepteurs NMDA. Le blocage d'autres récepteurs dont on sait que l'activation induit une augmentation de la quantité d'AMPc dans l'hippocampe comme les récepteurs β_1 -adrénergiques serait également nécessaire.

L'identification des cellules transfectées par le marqueur de l'AMPc reste très incertaine. Nous ne disposons que d'une observation morphologique. Nous ne sommes sûrs de la nature neuronale que pour un cas de cellule qui a été mesurée électrophysiologiquement. Nous ne pouvons pour l'instant pas affirmer si la production d'AMPc a lieu systématiquement dans un type cellulaire ou si elle est générale, si elle est neuronale ou gliale. De plus l'étude de la propagation de l'AMPc gagnerait également d'une meilleure définition géométrique des cellules mesurées.

Les résultats à propos d'une possible modulation du courant I_H pendant des épisodes oscillatoires et de son rôle dans l'amélioration de la synchronisation des oscillations restent indicatifs. Le suivi du courant I_H en tension imposée et la reproduction du blocage de I_H pendant des épisodes oscillatoires nous permettraient de confirmer ces résultats.

Enfin nous nous sommes contentés jusqu'à présent de mesurer des variations relatives de la $[AMPc]_i$. Nous pouvons maintenant utiliser une méthode de mesure des valeurs absolues de la $[AMPc]_i$ par deux longueurs d'onde d'excitation développée par Peter Salonikidis et André Zeug.

Chapitre 9

Validité et limitations des résultats

9.1 Pertinence des oscillations θ *in vitro* et en culture

L'étude des oscillations permet de relier la compréhension du traitement de l'information au niveau cellulaire et au niveau du réseau. La mesure extracellulaire des variations rythmiques de champ de potentiel donne une bonne image de l'activité de réseau d'une population de neurone, particulièrement dans des régions où ils sont organisés topologiquement comme dans les structures laminaires corticales. L'analyse des sources de courants responsables des champs de potentiel oscillants à fréquence θ montre qu'ils reflètent surtout les courants synaptiques [Buzsáki, 2002]. La mesure simultanée des variations de potentiel membranaire en mode cellule entière et courant imposé permet d'observer la génération de potentiel d'action au niveau d'une cellule en réponse à l'activité de réseau. On peut donc suivre le signal d'entrée propre à l'activité de réseau et le signal de sortie d'une cellule.

9.1.1 Modèles *in vitro* d'initiation des oscillations θ

Si l'on observe des oscillations θ spontanées dans des enregistrements *in vivo*, elles sont absentes des préparations *in vitro* comme les tranches. Il est cependant possible d'en provoquer par différent moyens pharmacologiques, essentiellement en augmentant l'excitabilité des neurones du réseau, et accessoirement, en abaissant le niveau d'inhibition dans le réseau.

Initiation d'oscillations θ par activation des récepteurs muscariniques

Dans l'hippocampe L'activation des récepteurs muscariniques inhibe le courant I_M dans les cellules pyramidales de la région CA1 des cochons d'inde [Halliwell and Adams, 1982]. L'inhibition du courant sortant I_M provoque une dépolarisation de toutes les cellules, ce qui augmente l'excitabilité de chacune. L'activation des récepteurs muscariniques M1/M3 dans les interneurons du *stratum oriens* inhibe aussi I_M et active I_{CaT} [Lawrence et al., 2006c]. La précision et la fidélité de décharge à des fréquences θ sont augmentées dans ces interneurons après activation des récepteurs muscariniques [Lawrence et al., 2006a]. Ces effets de l'activation des récepteurs muscariniques provoquent une augmentation de l'activité de réseau qui a tendance à se synchroniser autour de fréquence θ .

La génération d'oscillations θ *in vitro* dans l'hippocampe par activation pharmacologique des récepteurs cholinergiques mime en somme l'action des neurones septo-hippocampaux cholinergiques.

Dans le néocortex Dans le néocortex, l'activation des récepteurs muscariniques seule ne suffit pas à générer des oscillations θ . Il est nécessaire de réduire l'inhibition du réseau en utilisant une faible concentration de bicuculine. On n'observe pas d'oscillations θ dans toutes les régions du néocortex, mais uniquement dans le cortex entorhinal et dans le cortex visuel [Lukatch and MacIver, 1997] [Dickson and Alonso, 1997] [Castro-Alamancos et al., 2007].

9.1.2 Oscillations θ *in vitro* "résistantes à l'atropine"

Le blocage des récepteurs muscariniques par l'atropine fait disparaître les oscillations θ . Mais l'activation des récepteurs NMDA, sans l'activation des récepteurs AMPA, induit des oscillations θ résistantes à l'atropine [Gillies et al., 2002].

9.1.3 Oscillations θ dans les cultures organotypiques d'hippocampe

L'activation des récepteurs muscariniques induit aussi des oscillations θ dans les cultures hippocampales organotypiques. De plus des oscillations θ spontanées apparaissent dans des co-cultures septo-hippocampales [Fischer et al., 1999].

9.1.4 Oscillations θ *in vitro* et *in vivo*

Les oscillations θ générées *in vitro* par activation des récepteurs muscariniques ne reproduisent cependant pas exactement celles observées *in vivo*. Alors que les oscillations θ peuvent être continues dans un cerveau intact, les oscillations *in vitro* ne durent qu'un nombre fini de cycle. De plus le degré de synchronie des oscillations induites par le carbachol est bien plus élevé que celles observées *in vivo* [Buzsáki, 2002].

L'étude des oscillations *in vitro* permet donc surtout de déterminer les mécanismes par lesquels un réseau restreint de neurone est capable de produire une activité oscillante.

9.2 Mesure de la concentration en AMPc intracellulaire

Principes du FRET

Le transfert d'énergie par résonance de Förster se produit entre deux fluorophores quand le spectre d'émission de l'un (le donneur) recouvre le spectre d'excitation de l'autre (l'accepteur). L'efficacité du FRET est inversement proportionnelle à la puissance sixième de la distance entre les deux fluorophores. La distance pour laquelle l'efficacité de FRET est de 50 % s'appelle la distance de Förster.

Mesure du FRET par le rapport d'intensité d'émission

Chaque fluorophore peut être caractérisé par un spectre de longueurs d'onde d'excitation et un spectre de longueurs d'onde d'émission. L'excitation d'un fluorophore par un photon est suivie par l'émission d'un photon de moindre énergie. Nous avons évalué le FRET par le rapport entre l'intensité de l'émission du donneur sur l'intensité de l'émission de l'accepteur.

9.2.1 Indicateurs de la $[AMPc]_i$ basés sur le FRET

Plusieurs méthodes de mesure de l'AMPc intracellulaire basées sur le développement de constructions biomoléculaires au sein desquelles le transfert de l'énergie par résonance de Förster (FRET) est sensible à la concentration en AMPc ont été mises au point ces dernières années [Zaccolo et al., 2005].

La construction PKA-RII-YFP/PKA-C-CFP

La protéine kinase sensible à l'AMPc (PKA) est constituée de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice RII et une sous-unité catalytique C. En absence d'AMPc, les deux sous-unités forment un oligomère. L'AMPc provoque la séparation des deux sous-unités ce qui libère le site catalytique de la sous-unité C. Les protéines fluorescentes jaune et cyan (YFP et CFP pour *yellow fluorescent protein* et *cyan fluorescent protein*, variantes de la protéine fluorescente verte de méduse, GFP) forment une paire de fluorophores entre lesquels un transfert d'énergie par résonance de Förster peut avoir lieu. En fusionnant la sous-unité régulatrice de PKA RII avec YFP et la sous-unité catalytique C avec CFP, Zaccolo et al. ont obtenu un marqueur de l'AMPc. En absence d'AMPc, le complexe est oligomérisé. CFP et YFP sont à une distance l'une de l'autre proche de la distance de Förster (de l'ordre d'une dizaine de nanomètre) de telle sorte que le FRET a lieu : l'excitation spécifique de CFP provoque une émission de fluorescence des YFP et une diminution de l'intensité de fluorescence des CFP. Quand la $[AMPc]_i$ augmente, le complexe se sépare et la distance entre CFP et YFP augmente. L'efficacité du FRET diminue. Le rapport entre intensité de fluorescence de CFP sur celle de YFP augmente. Ce détecteur de l'AMPc basé sur PKA a été notamment utilisé pour décrire la compartimentalisation de la production d'AMPc dans les cellules cardiaques [Zaccolo and Pozzan, 2002][Mongillo et al., 2004].

La construction CFP-Epac-YFP

Un second détecteur de l'AMPc basé sur Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) a été depuis développé. Il est composé d'une protéine EPAC fusionnée avec une CFP et YFP aux extrémités N-terminale et C-terminale respectivement. La présence d'AMPc induit un dépliement d'EPAC. L'efficacité de FRET entre CFP et YFP diminue en présence d'AMPc. Le domaine dynamique de sensibilité de ce second détecteur est plus étendue qu'avec PKA. Peter Salonikidis et André Zeug montrent qu'il s'étend de 10 nM à 100 μ M avec un $K_{\frac{1}{2}} = 1\mu M$ (communication personnelle). La délétion du domaine de localisation membranaire DEP permet d'obtenir une protéine cytosolique qui interagit moins avec ces cibles originelles (notamment rap1). L'utilisation de ce mutant CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP donne d'ailleurs un meilleur rapport signal sur bruit [Ponsioen et al., 2004].

9.2.2 Suivi de la $[AMPc]_i$ par la mesure de l'efficacité du FRET

Nous avons suivi l'efficacité de FRET dans des cellules exprimant CFP-EPAC(δ DEP-CD)-YFP après transfection en mesurant le rapport entre intensité de fluorescence CFP et d'intensité de fluorescence YFP.

Comme nous n'utilisons qu'une longueur d'onde d'excitation et que nous normalisons les intensités de fluorescence sur l'intensité lumineuse de fond pour chaque canal, nous ne pouvons pas déterminer de valeurs absolues de $[AMPc]_i$ mais des variations relatives de $[AMPc]_i$.

9.3 Le courant I_H dans les conditions expérimentales

9.3.1 Le courant I_H et la température

Les propriétés cinétiques du courant I_H sont très sensibles à la température. La constante d'activation double presque entre 33°C et 23°C [Magee, 1998]. Dans les résultats présentés dans cette étude, les températures de mesure ne sont pas toutes les mêmes. L'observation des oscillations θ *in vitro* dans l'hippocampe et dans le néocortex ont été faite proche de températures physiologiques (38°C). La détermination de la précision des couplages E-S et I-S ont été faite à une température usuelle pour ces protocoles (34°C) et les expériences sur cultures organotypiques ont été réalisées à température ambiante (\approx 24°C). Les cinétiques des courants I_H dans chacune de ces conditions ne sont certainement pas comparables.

9.3.2 Variation de la sensibilité du courant I_H à l'AMPc pendant le développement

La balance moléculaire de HCN2 à HCN1 après la troisième semaine dans les cellules pyramidales de CA1 provoque une diminution de la sensibilité à l'AMPc du courant I_H simultanément à une augmentation générale de la concentration en AMPc [Surges et al., 2006]. Nous ne savons pas si cette balance moléculaire a lieu dans les cultures hippocampales. De toute manière nous avons travaillé sur des cultures entre une et deux semaines en culture. (souris sacrifiées à une 5 jours postnatal; soit entre 2 et 3 semaines si on peut

comparer). Nous pouvons prédire que notre étude est valide pour les trois première semaines postnatales, quand le courant I_H est très sensible à l'AMPc. Est ce que d'autre mécanismes de modulation de l'AMPc (PIP2, phosphorylation...) pendant les oscillations θ prennent ensuite le relais ?

Chapitre 10

Perspectives

10.1 I_H , le bouton de modulation de fréquence du codage temporel ?

D'une part le courant I_H joue un rôle clef dans plusieurs phénomènes rythmiques propres au système nerveux central comme les oscillations θ dans les structures corticales, mais aussi dans les rythmes thalamo-corticaux et au niveau de l'olive inférieure. D'autre part les propriétés cinétiques du courant I_H sont très modulables. À court terme, l'interaction directe avec l'AMPc, accélère ses cinétiques d'activation et de désactivation et décale le domaine d'activation vers des potentiels de membrane plus dépolarisés (2.2.4). Récemment il a été montré que PIP2 agirait de même [Zolles et al., 2006][Pian et al., 2006][Fogle et al., 2007]. À moyen terme, les canaux HCN sont susceptibles d'être phosphorylés. Plusieurs protéines d'échafaudage ont été identifiées qui interagissent avec l'une ou l'autre des isoformes de HCN [Wang et al., 2001][Gravante et al., 2004][Kimura et al., 2004]. Le transport des canaux HCN peut-être une autre façon de modifier à moyen terme la densité de conductance I_H et la composition en isoforme au niveau d'un compartiment subcellulaire. À long terme enfin, le niveau d'expression des différents isoformes de HCN peut varier (2.3.2). Or chaque isoforme HCN a des propriétés cinétiques et une sensibilité à l'AMPc propres [Stieber et al., 2005]. Et la formation possible de canaux HCN hétéromères augmente encore la diversité moléculaire des canaux HCN [Chen et al., 2001b][Altomare et al., 2003].

Dans notre étude, nous proposons que la modulation des cinétiques du courant I_H peut agir sur les caractéristiques des oscillations. L'effet de l'augmentation ou de la diminution de la $[AMPc]_i$ dans les cellules cardiaques sur la fréquence cardiaque est bien étudiée

(2.4.1, Fig. 2.7). La production d'AMPc dans les cellules thalamo-corticales contrôle l'activité rythmique [Lüthi and McCormick, 1998b]. Nos résultats indiquent que la production d'AMPc induite par l'augmentation de l'activité synaptique pendant des oscillations θ dans l'hippocampe pourrait moduler aussi I_H et réguler la synchronisation des oscillations.

Le courant I_H semble donc jouer dans plusieurs systèmes le rôle de modulateur de fréquence. Deux caractéristiques du courant I_H sont importantes pour cette fonction de modulation de fréquence :

- les cinétiques d'activation et de désactivation sont telles que le courant I_H agit toujours avec un retard par rapport aux changements de membrane dans lesquels il est impliqué.
- le courant I_H peut être modulé par un grand nombre de facteur.

Il serait intéressant de poursuivre à analyser les cas où une modulation du courant I_H permet une régulation des rythmes dans le SNC.

10.2 Le courant I_H , un acteur parmi d'autres du codage temporel. Le courant I_H , jamais cavalier seul ?

Le courant I_H agit toujours en interrelation avec d'autres courants ioniques. Comme nous l'avons vu (3.2.1), le courant I_H participe à la définition de la fréquence de résonance avec I_{KIR} , I_M et $I_{Na,P}$ [Hu et al., 2002]. L'interaction entre I_{KIR} et I_H joue également un rôle dans l'intégration dendritique des synapses glutamatergiques. Le courant I_H accélère la repolarisation consécutive aux PPSE, ce qui diminue la sommation temporelle, mais provoque une légère hyperpolarisation suite à une série de bouffées de glutamate délivrées par iontophorèse. Le courant I_{KIR} empêche cette légère hyperpolarisation de se produire [Takigawa and Alzheimer, 2003]. Or les canaux I_{KIR} activés par les protéines G (GIRK) sont activés via les récepteurs muscariniques M2 dans les cellules pyramidales de CA1 [Seeger and Alzheimer, 2001]. On peut donc s'attendre à ce que ces courants jouent également un rôle dans la synchronisation des oscillations θ , spécialement celles entraînées par une stimulation cholinergique originaire du septum.

Nous avons déjà discuté comment I_H et I_M ont des comportements analogues, le premier dans le domaine de potentiel de membrane hyperpolarisé, le second dans le domaine dépolarisé. En effet I_M est activé par la dépolarisation mais conduit un courant sortant. Il ne s'inactive pas, et quand il est activé à un niveau basale au potentiel de repos, l'hyperpolarisation le désactive, ce qui induit un courant virtuellement entrant. Donc, à

l'instar de I_H , I_M s'oppose à tous changements de potentiel de membrane. La cinétique de I_M est également lente. Il introduit donc un retard dans la réponse de membrane, ce qui explique son rôle dans des phénomènes oscillatoires comme la fréquence de résonance. La suppression de l'expression des canaux du courant I_M (KCNQ2) augmente l'excitabilité des cellules pyramidales de CA1 et perturbe ses capacités d'intégration temporelle (seuil de résonance θ diminué, AHP plus faible, moindre adaptation de décharge). De plus des mutations sur KCNQ2 et KCNQ3 sont souvent associés chez l'humain à des syndromes épileptiques [Peters et al., 2004]. Dans les interneurons du *stratum oriens*, I_M contrôle la régulation de l'ISI dans les interneurons du str. Oriens [Lawrence et al., 2006b]. Or l'activation des récepteurs muscariniques module la conductance I_M et corrélativement la précision de décharge des interneurons du *stratum oriens* [Lawrence et al., 2006a].

Il est donc très probable que l'on retrouve la complémentarité observée pour la fréquence de résonance entre I_H , I_{KIR} et I_M dans la synchronisation des oscillations θ en particulier et dans l'organisation temporelle de l'activité de réseau par les propriétés intrinsèques des neurones en général.

Amplification différenciée des PPSE selon la localisation de leur génération

Le même courant synaptique simulé injecté en courant imposé est amplifié dans les dendrites proximales par rapport au soma grâce à des courants sodiques de telle sorte qu'il a une plus forte probabilité de générer un PA [Oviedo and Reyes, 2002]. Cette amplification est atténuée par le courant I_H quand on s'éloigne du soma le long des dendrites, puis augmentée dans les dendrites apicales par le courant I_{CaT} [Oviedo and Reyes, 2005]. (Figure. 10.1)

Le contrôle de l'organisation temporelle de l'intégration synaptique peut donc être aussi spatiale. La modification du courant I_H spécifiquement dans un compartiment cellulaire peut favoriser ou défavoriser les entrées synaptiques propres à ce compartiment. Il a été en effet montré dans des protocoles de plasticité que la conductance I_H diminue suite à une intense stimulation des collatérales de Schaffer à des fréquence θ [Fan et al., 2005]. Par contre un protocole plus doux de potentialisation à long terme par stimulations appariées induit plutôt une augmentation locale de la conductance I_H [Campanac et al., 2007]. Ces plasticités locales à long terme de la conductance I_H pourraient avoir des corrélaires à court terme via des variations de la $[AMPc]_i$.

KO de HCN

La suppression de l'expression de HCN1 n'entraîne pas de disparition des oscillations θ [Nolan et al., 2003][Nolan et al., 2004]. Par contre la suppression de l'expression de HCN2 provoque une activité semblable à une crise épileptique d'absence et une dysrythmie cardiaque [Ludwig et al., 2003]. Cependant les organismes KO peuvent développer des mécanismes homéostatiques pour rétablir des fonctions essentielles. On a à faire à des redondances fonctionnelles entre gènes.

On pourrait aussi vérifier dans les rats KO HCN1 la "qualité" des oscillations θ comme nous l'avons fait ici *in vitro*.

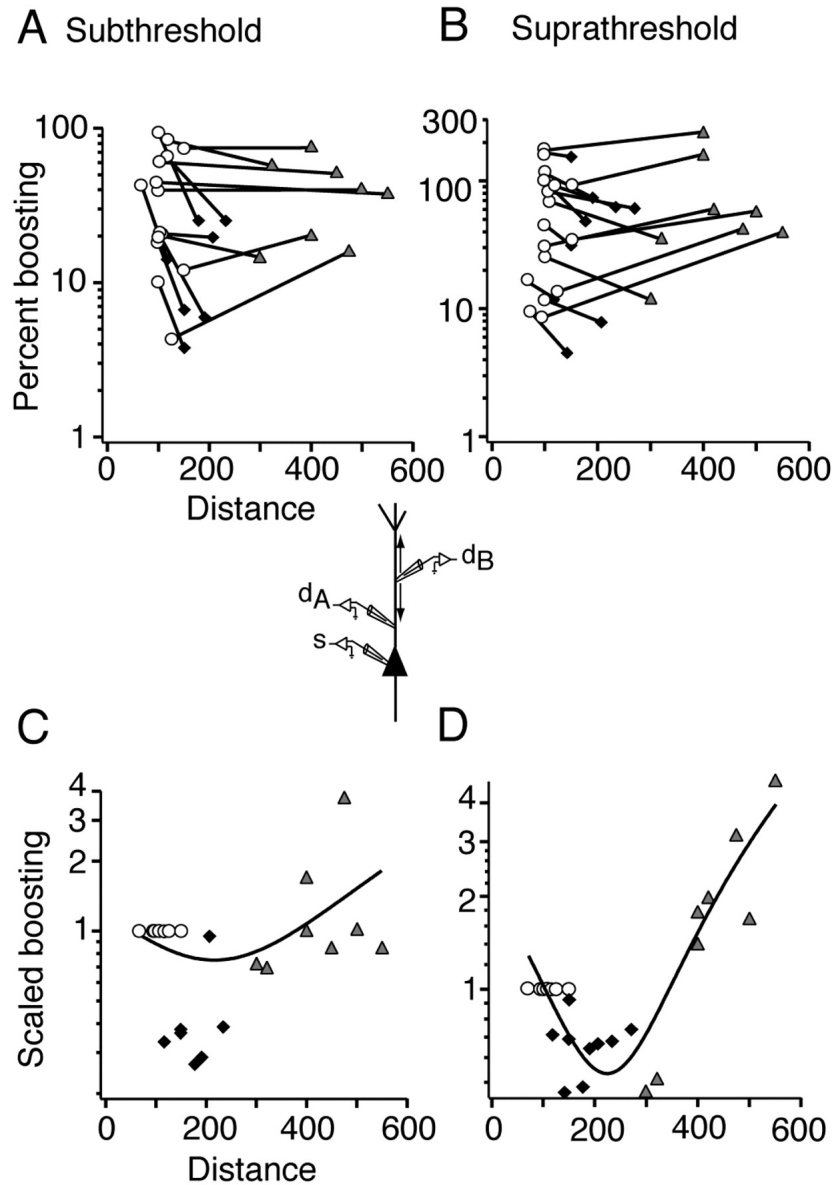


Fig. 10.1: L'influence des courants ioniques intrinsèques sur les PPSE dépendent de leur localisation

Pourcentage d'amplification entre la réponse à un patron artificiel de CPSE composite injecté dans le soma ou dans les dendrites mesuré sur son site de génération. A,C : réponse infraliminaire ; rapport des amplitudes des potentiels. B,D : réponse supraliminaire ; rapport des taux de décharge.

L'amplification de la réponse est important dès les dendrites proximales, il est plus modéré dans les dendrites intermédiaire et il augmente fortement dans les dendrites apicales. (Extrait de [Oviedo and Reyes, 2002])

Bibliographie

- [Accili et al., 2002] Accili, E. A., Proenza, C., Baruscotti, M., and DiFrancesco, D. (2002). From funny current to hcn channels : 20 years of excitement. *News Physiol Sci*, 17 :32–37.
- [Altomare et al., 2003] Altomare, C., Terragni, B., Brioschi, C., Milanesi, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M., and DiFrancesco, D. (2003). Heteromeric hcn1-hcn4 channels : a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol*, 549(Pt 2) :347–359.
- [Ang et al., 2005] Ang, C. W., Carlson, G. C., and Coulter, D. A. (2005). Hippocampal ca1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies. *J. Neurosci.*, 25(42) :9567–9580.
- [Aponte et al., 2006] Aponte, Y., Lien, C.-C., Reisinger, E., and Jonas, P. (2006). Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 574(1) :229–243.
- [Arinsburg et al., 2006] Arinsburg, S. S., Cohen, I. S., and Yu, H. G. (2006). Constitutively active src tyrosine kinase changes gating of hcn4 channels through direct binding to the channel proteins. *J Cardiovasc Pharmacol*, 47(4) :578–586.
- [Attwell and Wilson, 1980] Attwell, D. and Wilson, M. (1980). Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J Physiol*, 309 :287–315.
- [Axmacher and Miles, 2004] Axmacher, N. and Miles, R. (2004). Intrinsic cellular currents and the temporal precision of epsp-action potential coupling in ca1 pyramidal cells. *J Physiol*, 555(3) :713–725.
- [Azouz and Gray, 2000] Azouz, R. and Gray, C. M. (2000). Dynamic spike threshold reveals a mechanism for synaptic coincidence detection in cortical neurons in vivo. *PNAS*, 97(14) :8110–8115.
- [Bal and McCormick, 1996] Bal, T. and McCormick, D. A. (1996). What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron*, 17(2) :297–308.

- [Bal and McCormick, 1997] Bal, T. and McCormick, D. A. (1997). Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current $i(h)$. *J Neurophysiol*, 77(6) :3145–3156.
- [Barnes et al., 2005] Barnes, A. P., Livera, G., Huang, P., Sun, C., O’Neal, W. K., Conti, M., Stutts, M. J., and Milgram, S. L. (2005). Phosphodiesterase 4d forms a camp diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium. *J Biol Chem*, 280(9) :7997–8003.
- [Baruscotti et al., 2005] Baruscotti, M., Bucchi, A., and DiFrancesco, D. (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol Ther*, 107(1) :59–79.
- [Beaumont and Zucker, 2000] Beaumont, V. and Zucker, R. S. (2000). Enhancement of synaptic transmission by cyclic amp modulation of presynaptic i_h channels. *Nat Neurosci*, 3(2) :133–141.
- [Bender et al., 2001] Bender, R. A., Brewster, A., Santoro, B., Ludwig, A., Hofmann, F., Biel, M., and Baram, T. Z. (2001). Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience*, 106(4) :689–698.
- [Bender et al., 2005] Bender, R. A., Galindo, R., Mameli, M., Gonzalez-Vega, R., Valenzuela, F. C., and Baram, T. Z. (2005). Synchronized network activity in developing rat hippocampus involves regional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (hcn) channel function. *European Journal of Neuroscience*, 22(10) :2669–2674.
- [Bender et al., 2003] Bender, R. A., Soleymani, S. V., Brewster, A. L., Nguyen, S. T., Beck, H., Mathern, G. W., and Baram, T. Z. (2003). Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (hcn) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. *J Neurosci*, 23(17) :6826–6836.
- [Berger et al., 2001] Berger, T., Larkum, M. E., and Lüscher, H. R. (2001). High $i(h)$ channel density in the distal apical dendrite of layer v pyramidal cells increases bidirectional attenuation of epsps. *J Neurophysiol*, 85(2) :855–868.
- [Berger and Luscher, 2003] Berger, T. and Luscher, H.-R. (2003). Timing and precision of spike initiation in layer v pyramidal cells of the rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex*, 13(3) :274–281.
- [Bergles, 2005] Bergles, D. E. (2005). Shape-shifting at a cerebellar synapse allows sub-millisecond signaling. *Nature Neuroscience*, 8(10) :1279–1281.
- [Bickmeyer et al., 2002] Bickmeyer, U., Heine, M., Manzke, T., and Richter, D. W. (2002). Differential modulation of $i(h)$ by 5-HT receptors in mouse ca1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 16(2) :209–218.

- [Bond et al., 2005] Bond, C. T., Maylie, J., and Adelman, J. P. (2005). Sk channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol*, 15(3) :305–311.
- [BoSmith et al., 1993] BoSmith, R. E., Briggs, I., and Sturgess, N. C. (1993). Inhibitory actions of zeneca zd7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (if) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol*, 110(1) :343–349.
- [Boudkkazi et al., 2007] Boudkkazi, S., Ankri, N., Carlier, E., and Debanne, D. (2007). *submitted*.
- [Bowen and Martin,] Bowen, W. J. and Martin, H. L. The diffusion of adenosine triphosphate through aqueous solutions. *Arch Biochem Biophys*, pages 30–36.
- [Bräuer et al., 2001] Bräuer, A. U., Savaskan, N. E., Kole, M. H., Plaschke, M., Monteggia, L. M., Nestler, E. J., Simburger, E., Deisz, R. A., Ninnemann, O., and Nitsch, R. (2001). Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion. *FASEB J*, 15(14) :2689–2701.
- [Brewster et al., 2002] Brewster, A., Bender, R. A., Chen, Y., Dube, C., Eghbal-Ahmadi, M., and Baram, T. Z. (2002). Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci*, 22(11) :4591–4599.
- [Brewster et al., 2005] Brewster, A. L., Bernard, J. A., Gall, C. M., and Baram, T. Z. (2005). Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (hcn) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol Dis*, 19(1-2) :200–207.
- [Brewster et al., 2006] Brewster, A. L. L., Chen, Y., Bender, R. A. A., Yeh, A., Shigemoto, R., and Baram, T. Z. Z. (2006). Quantitative analysis and subcellular distribution of mrna and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cereb Cortex*.
- [Bringuier et al., 1997] Bringuier, V., Frégnac, Y., Baranyi, A., Debanne, D., and Shulz, D. E. (1997). Synaptic origin and stimulus dependency of neuronal oscillatory activity in the primary visual cortex of the cat. *J Physiol*, 500 (Pt 3) :751–774.
- [Brown et al., 1979] Brown, H. F., Difrancesco, D., and Noble, S. J. (1979). How does adrenaline accelerate the heart? *NATURE (LONDON)*, 280(5719) :235–236.
- [Bucchi et al., 2006] Bucchi, A., Tognati, A., Milanesi, R., Baruscotti, M., and Difrancesco, D. (2006). Properties of ivabradine-induced block of hcn1 and hcn4 channels. *J Physiol*.

- [Budde et al., 2005] Budde, T., Caputi, L., Kanyshkova, T., Staak, R., Abrahamczik, C., Munsch, T., and Pape, H. C. (2005). Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. *J Neurosci*, 25(43) :9871–9882.
- [Bullis et al., 2006] Bullis, J. B. B., Jones, T. D. D., and Poolos, N. P. P. (2006). Reversed somatodendritic ih gradient in a class of hippocampal neurons with pyramidal morphology. *J Physiol*.
- [Buzsáki, 2002] Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3) :325–340.
- [Cacheaux et al., 2005] Cacheaux, L. P. P., Topf, N., Tibbs, G. R. R., Schaefer, U. R. R., Levi, R., Harrison, N. L. L., Abbott, G. W. W., and Goldstein, P. A. A. (2005). Impairment of hcn channel function by the intravenous general anesthetic propofol. *J Pharmacol Exp Ther*.
- [Campanac et al., 2007] Campanac, E., Ankri, N., and Debanne, D. (2007). *submitted*.
- [Castro-Alamancos et al., 2007] Castro-Alamancos, Manuel, A., Rigas, Pavlos, Tawara-Hirata, and Yoshie (2007). Resonance (10 hz) of excitatory networks in motor cortex : effects of voltage-dependent ion channel blockers. *The Journal of Physiology*, 578(1) :173–191.
- [Cathala et al., 2003] Cathala, L., Brickley, S., Cull-Candy, S., and Farrant, M. (2003). Maturation of epscs and intrinsic membrane properties enhances precision at a cerebellar synapse. *J Neurosci*, 23(14) :6074–6085.
- [Cathala et al., 2005] Cathala, L., Holderith, N. B., Nusser, Z., Digregorio, D. A., and Cull-Candy, S. G. (2005). Changes in synaptic structure underlie the developmental speeding of ampa receptor-mediated epscs. *Nature Neuroscience*, 8(10) :1310–1318.
- [Chen et al., 1999] Chen, C., Nakamura, T., and Koutalos, Y. (1999). Cyclic amp diffusion coefficient in frog olfactory cilia. *Biophys J*, 76(5) :2861–2867.
- [Chen et al., 2001a] Chen, K., Aradi, I., Thon, N., Eghbal-Ahmadi, M., Baram, T. Z., and Soltesz, I. (2001a). Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med*, 7(3) :331–337.
- [Chen et al., 2001b] Chen, S., Wang, J., and Siegelbaum, S. A. (2001b). Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of hcn1 and hcn2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol*, 117(5) :491–504.
- [Chen et al., 2007] Chen, S., Wang, J., Zhou, L., George, M. S., and Siegelbaum, S. A. (2007). Voltage sensor movement and camp binding allosterically regulate an inherently voltage-independent closed-open transition in hcn channels. *J Gen Physiol*, 129(2) :175–188.

- [Chen et al., 2005a] Chen, X., Shu, S., and Bayliss, D. A. A. (2005a). Suppression of ih contributes to propofol-induced inhibition of mouse cortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*.
- [Chen et al., 2005b] Chen, X., Sirois, J. E., Lei, Q., Talley, E. M., Lynch, C., and Bayliss, D. A. (2005b). Hcn subunit-specific and camp-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents. *J Neurosci*, 25(24) :5803–5814.
- [Chern, 2000] Chern, Y. (2000). Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cell Signal*, 12(4) :195–204.
- [Chetkovich et al., 1991] Chetkovich, D. M., Gray, R., Johnston, D., and Sweatt, J. D. (1991). N-methyl-d-aspartate receptor activation increases camp levels and voltage-gated ca²⁺ channel activity in area ca1 of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(15) :6467–6471.
- [Chetkovich and Sweatt, 1993] Chetkovich, D. M. and Sweatt, J. D. (1993). nmda receptor activation increases cyclic amp in area ca1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *J Neurochem*, 61(5) :1933–1942.
- [Chevaleyre and Castillo, 2002] Chevaleyre, V. and Castillo, P. E. (2002). Assessing the role of ih channels in synaptic transmission and mossy fiber ltp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14) :9538–9543.
- [Cobb et al., 1995] Cobb, S. R., Buhl, E. H., Halasy, K., Paulsen, O., and Somogyi, P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual gabaergic interneurons. *Nature*, 378(6552) :75–78.
- [Cobb et al., 2003] Cobb, S. R., Larkman, P. M., Bulters, D. O., Oliver, L., Gill, C. H., and Davies, C. H. (2003). Activation of ih is necessary for patterning of mglur and machr induced network activity in the hippocampal ca3 region. *Neuropharmacology*, 44(3) :293–303.
- [Cooper, 2005] Cooper, D. M. (2005). Compartmentalization of adenylate cyclase and camp signalling. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6) :1319–1322.
- [Craven and Zagotta, 2005] Craven, K. B. B. and Zagotta, W. N. N. (2005). Cng and hcn channels : Two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*.
- [Csicsvari et al., 2003] Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K. D., and Buzsáki, G. (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, 37(2) :311–322.
- [Debanne, 2004] Debanne, D. (2004). Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci*, 5(4) :304–316.
- [Demontis et al., 1999] Demontis, G. C., Longoni, B., Barcaro, U., and Cervetto, L. (1999). Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J Physiol*, 515 (Pt 3) :813–828.

- [Dickson and Alonso, 1997] Dickson, C. T. and Alonso, A. (1997). Muscarinic induction of synchronous population activity in the entorhinal cortex. *J Neurosci*, 17(17) :6729–6744.
- [Dickson et al., 2000] Dickson, C. T., Magistretti, J., Shalinsky, M. H., Fransén, E., Hasselmo, M. E., and Alonso, A. (2000). Properties and role of $i(h)$ in the pacing of sub-threshold oscillations in entorhinal cortex layer ii neurons. *J Neurophysiol*, 83(5) :2562–2579.
- [DiFrancesco, 1981a] DiFrancesco, D. (1981a). A new interpretation of the pace-maker current in calf purkinje fibres. *J Physiol*, 314 :359–376.
- [DiFrancesco, 1981b] DiFrancesco, D. (1981b). A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf purkinje fibres. *J Physiol*, 314 :377–393.
- [DiFrancesco, 1993] DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annual Review Of Physiology*, 55 :455–472.
- [DiFrancesco, 2006] DiFrancesco, D. (2006). Serious workings of the funny current. *Prog Biophys Mol Biol*, 90(1-3) :13–25.
- [DiFrancesco et al., 1986] DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M., and Tromba, C. (1986). Properties of the hyperpolarizing-activated current (i_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol*, 377 :61–88.
- [DiFrancesco and Ojeda, 1980] DiFrancesco, D. and Ojeda, C. (1980). Properties of the current i_f in the sino-atrial node of the rabbit compared with those of the current i_k , in purkinje fibres. *J Physiol*, 308 :353–367.
- [DiFrancesco and Tortora, 1991] DiFrancesco, D. and Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic amp. *Nature*, 351(6322) :145–147.
- [Elhilali et al., 2004] Elhilali, M., Fritz, J. B., Klein, D. J., Simon, J. Z., and Shamma, S. A. (2004). Dynamics of precise spike timing in primary auditory cortex. *J Neurosci*, 24(5) :1159–1172.
- [Erchova et al., 2004] Erchova, Kreck, G., Heinemann, U., and Herz (2004). Dynamics of rat entorhinal cortex layer ii and iii cells : characteristics of membrane potential resonance at rest predict oscillation properties near threshold. *J Physiol (Lond)*, 560(1) :89–110.
- [Fan et al., 2005] Fan, Y., Fricker, D., Brager, D. H., Chen, X., Lu, H.-C., Chitwood, R. A., and Johnston, D. (2005). Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in i_h . *Nature Neuroscience*, 8(11) :1542–1551.
- [Fellous and Sejnowski, 2000] Fellous, J. M. and Sejnowski, T. J. (2000). Cholinergic induction of oscillations in the hippocampal slice in the slow (0.5-2 hz), theta (5-12 hz), and gamma (35-70 hz) bands. *Hippocampus*, 10(2) :187–197.

- [Fetz and Gustafsson, 1983] Fetz, E. E. and Gustafsson, B. (1983). Relation between shapes of post-synaptic potentials and changes in firing probability of cat motoneurons. *J Physiol*, 341 :387–410.
- [Fischer et al., 1999] Fischer, Y., Gähwiler, B. H., and Thompson, S. M. (1999). Activation of intrinsic hippocampal theta oscillations by acetylcholine in rat septo-hippocampal cocultures. *J Physiol*, 519 Pt 2 :405–413.
- [Fogle et al., 2007] Fogle, K. J., Lyashchenko, A. K., Turbendian, H. K., and Tibbs, G. R. (2007). Hcn pacemaker channel activation is controlled by acidic lipids downstream of diacylglycerol kinase and phospholipase a2. *J Neurosci*, 27(11) :2802–2814.
- [Förster, 1948] Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(2) :55–75.
- [Fox, 2000] Fox, K. (2000). Timing is everything. *Neuron*, 27(1) :1–3.
- [Frace et al., 1992] Frace, A. M., Maruoka, F., and Noma, A. (1992). Control of the hyperpolarization-activated cation current by external anions in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*, 453 :307–318.
- [Franz et al., 2000] Franz, O., Liss, B., Neu, A., and Roeper, J. (2000). Single-cell mrna expression of hcn1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (ih) in central neurons. *Eur J Neurosci*, 12(8) :2685–2693.
- [Fricker and Miles, 2000] Fricker, D. and Miles, R. (2000). Epsp amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron*, 28(2) :559–569.
- [Fricker and Miles, 2001] Fricker, D. and Miles, R. (2001). Interneurons, spike timing, and perception. *Neuron*, 32(5) :771–774.
- [Furukawa and Middlebrooks, 2002] Furukawa, S. and Middlebrooks, J. C. (2002). Cortical representation of auditory space : information-bearing features of spike patterns. *J Neurophysiol*, 87(4) :1749–1762.
- [Gähwiler, 1981] Gähwiler, B. H. (1981). Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 4(4) :329–342.
- [Gähwiler, 1988] Gähwiler, B. H. (1988). Organotypic cultures of neural tissue. *Trends Neurosci*, 11(11) :484–489.
- [Galarreta and Hestrin, 1999] Galarreta, M. and Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, 402(6757) :72–75.
- [Galarreta and Hestrin, 2002] Galarreta, M. and Hestrin, S. (2002). Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking gabaergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19) :12438–12443.

- [Gardiner et al., 1995] Gardiner, S. M., Kemp, P. A., March, J. E., and Bennett, T. (1995). Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, s16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol*, 115(4) :579–586.
- [Gastreïn et al., 2007] Gastreïn, P., Campanac, E., Ankri, N., and Debanne, D. (2007). ? *submitted*.
- [Gillessen and Alzheimer, 1997] Gillessen, T. and Alzheimer, C. (1997). Amplification of epsps by low $\text{ni}(2+)$ - and amiloride-sensitive $\text{ca}2+$ channels in apical dendrites of rat $\text{ca}1$ pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 77(3) :1639–1643.
- [Gillies et al., 2002] Gillies, M. J., Traub, R. D., LeBeau, F. E., Davies, C. H., Gloveli, T., Buhl, E. H., and Whittington, M. A. (2002). A model of atropine-resistant theta oscillations in rat hippocampal area $\text{ca}1$. *J Physiol*, 543(Pt 3) :779–793.
- [Goldberg et al., 2006] Goldberg, J. A. A., Deister, C. A. A., and Wilson, C. J. J. (2006). Response properties and synchronization of rhythmically-firing dendritic neurons. *J Neurophysiol*.
- [Gordon et al., 1998] Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B., and Herman, B. (1998). Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J*, 74(5) :2702–2713.
- [Gravante et al., 2004] Gravante, B., Barbuti, A., Milanesi, R., Zappi, I., Viscomi, C., and DiFrancesco, D. (2004). Interaction of the pacemaker channel $\text{hcn}1$ with filamin a. *J Biol Chem*, 279(42) :43847–43853.
- [Gu et al., 2005] Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., and Storm, J. F. (2005). $\text{Kv}7/\text{kc}nq/m$ and hcn/h , but not $\text{kca}2/\text{sk}$ channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in $\text{ca}1$ hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, 566(3) :689–715.
- [Haas and White, 2002] Haas, J. S. and White, J. A. (2002). Frequency selectivity of layer ii stellate cells in the medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol*, 88(5) :2422–2429.
- [Halliwell and Adams, 1982] Halliwell, J. V. and Adams, P. R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res*, 250(1) :71–92.
- [Hardie and Pearce, 2006] Hardie, J. B. and Pearce, R. A. (2006). Active and passive membrane properties and intrinsic kinetics shape synaptic inhibition in hippocampal $\text{ca}1$ pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 26(33) :8559–8569.
- [Harris and Constanti, 1995] Harris, N. C. and Constanti, A. (1995). Mechanism of block by zd 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 74(6) :2366–2378.
- [Hart, 1983] Hart, G. (1983). The kinetics and temperature dependence of the pacemaker current in sheep purkinje fibres. *J Physiol*, 337 :401–416.

- [Hasenstaub et al., 2005] Hasenstaub, A., Shu, Y., Haider, B., Kraushaar, U., Duque, A., and McCormick, D. A. (2005). Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks. *Neuron*, 47(3) :423–435.
- [Heil, 2004] Heil, P. (2004). First-spike latency of auditory neurons revisited. *Curr Opin Neurobiol*, 14(4) :461–467.
- [Hestrin, 1987] Hestrin, S. (1987). The properties and function of inward rectification in rod photoreceptors of the tiger salamander. *J Physiol*, 390 :319–333.
- [Ho et al., 1994] Ho, W. K., Brown, H. F., and Noble, D. (1994). High selectivity of the i(f) channel to na⁺ and k⁺ in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflugers Arch*, 426(1-2) :68–74.
- [Hu et al., 2002] Hu, H., Vervaeke, K., and Storm, J. F. (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by m-current, h-current and persistent na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, 545(Pt 3) :783–805.
- [Hutcheon et al., 1996a] Hutcheon, B., Miura, R. M., and Puil, E. (1996a). Models of subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *J Neurophysiol*, 76(2) :698–714.
- [Hutcheon et al., 1996b] Hutcheon, B., Miura, R. M., and Puil, E. (1996b). Subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *J Neurophysiol*, 76(2) :683–697.
- [Hutcheon and Yarom, 2000] Hutcheon, B. and Yarom, Y. (2000). Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci*, 23(5) :216–222.
- [Jackson et al., 2007] Jackson, H. A. A., Marshall, C. R. R., and Accili, E. A. A. (2007). The evolution and structural diversification of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (hcn) channel genes. *Physiol Genomics*.
- [Johansson and Birznieks, 2004] Johansson, R. S. and Birznieks, I. (2004). First spikes in ensembles of human tactile afferents code complex spatial fingertip events. *Nat Neurosci*, 7(2) :170–177.
- [Karpen and Rich, 2001] Karpen, J. W. and Rich, T. C. (2001). The fourth dimension in cellular signaling. *Science*, 293(5538) :2204–2205.
- [Katz, 1949] Katz, B. (1949). Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.*, (3) :285–299.
- [Kaupp and Seifert, 2001] Kaupp, U. B. and Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol*, 63 :235–257.
- [Kimura et al., 2004] Kimura, K., Kitano, J., Nakajima, Y., and Nakanishi, S. (2004). Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated hcn2 cation channel forms a protein assembly with multiple neuronal scaffold proteins in distinct modes of protein-protein interaction. *Genes Cells*, 9(7) :631–640.

- [Kitayama et al., 2002] Kitayama, M., Taguchi, T., Miyata, H., Matsuda, Y., Yamauchi, T., and Kogure, S. (2002). The extracellular current blocking effect of cesium chloride on the theta wave in the rabbit hippocampal ca1 region. *Neurosci Lett*, 334(1) :45–48.
- [Klausberger et al., 2003] Klausberger, T., Magill, P. J., Márton, L. F., Roberts, J. D., Cobden, P. M., Buzsáki, G., and Somogyi, P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature*, 421(6925) :844–848.
- [Klausberger et al., 2004] Klausberger, T., Márton, L. F., Baude, A., Roberts, J. D., Magill, P. J., and Somogyi, P. (2004). Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci*, 7(1) :41–47.
- [Knaus et al., 2007] Knaus, A., Zong, X., Beetz, N., Jahns, R., Lohse, M. J. J., Biel, M., and Hein, L. (2007). Direct inhibition of cardiac hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated pacemaker channels by clonidine. *Circulation*.
- [Kole et al., 2007] Kole, Maarten, H. P., Brauer, Anja, U., Stuart, and Greg, J. (2007). Inherited cortical hcn1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. *The Journal of Physiology*, 578(2) :507–525.
- [Konopacki et al., 1987] Konopacki, J., MacIver, M. B., Bland, B. H., and Roth, S. H. (1987). Carbachol-induced eeg 'theta' activity in hippocampal brain slices. *Brain Res*, 405(1) :196–198.
- [Lakowicz, 2006] Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer.
- [Lampl and Yarom, 1997] Lampl, I. and Yarom, Y. (1997). Subthreshold oscillations and resonant behavior : two manifestations of the same mechanism. *Neuroscience*, 78(2) :325–341.
- [Lancaster et al., 2001] Lancaster, B., Hu, H., Ramakers, G. M., and Storm, J. F. (2001). Interaction between synaptic excitation and slow afterhyperpolarization current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, 536(Pt 3) :809–823.
- [Lawrence et al., 2006a] Lawrence, J. J., Grinspan, Z. M., Statland, J. M., and Mcbain, C. J. (2006a). Muscarinic receptor activation tunes mouse stratum oriens interneurons to amplify spike reliability. *The Journal of Physiology*, 571(3) :555–562.
- [Lawrence et al., 2006b] Lawrence, J. J., Saraga, F., Churchill, J. F., Statland, J. M., Travis, K. E., Skinner, F. K., and Mcbain, C. J. (2006b). Somatodendritic kv7/kcnq/m channels control interspike interval in hippocampal interneurons. *J. Neurosci.*, 26(47) :12325–12338.
- [Lawrence et al., 2006c] Lawrence, J. J., Statland, J. M., Grinspan, Z. M., and Mcbain, C. J. (2006c). Cell type-specific dependence of muscarinic signalling in mouse hippocampal stratum oriens interneurons. *The Journal of Physiology*, 570(3) :595–610.

- [Leao et al., 2006] Leao, Katarina, E., Leao, Richardson, N., Sun, Hong, Fyffe, Robert, E. W., Walmsley, and Bruce (2006). Hyperpolarization-activated currents are differentially expressed in mice brainstem auditory nuclei. *The Journal of Physiology*, 576(3) :849–864.
- [Lenz et al., 1997] Lenz, R. A., Pitler, T. A., and Alger, B. E. (1997). High intracellular Cl^- concentrations depress g-protein-modulated ionic conductances. *J Neurosci*, 17(16) :6133–6141.
- [Leung and Yu, 1998] Leung, L. S. and Yu, H. W. (1998). Theta-frequency resonance in hippocampal ca1 neurons in vitro demonstrated by sinusoidal current injection. *J Neurophysiol*, 79(3) :1592–1596.
- [Lörincz et al., 2002] Lörincz, A., Notomi, T., Tamás, G., Shigemoto, R., and Nusser, Z. (2002). Polarized and compartment-dependent distribution of hcn1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci*, 5(11) :1185–1193.
- [Ludwig et al., 2003] Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M., and Hofmann, F. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel hcn2. *EMBO J*, 22(2) :216–224.
- [Ludwig et al., 1998] Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., and Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393(6685) :587–591.
- [Lujan et al., 2005] Lujan, R., Albasanz, J. L., Shigemoto, R., and Juiz, J. M. (2005). Preferential localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel subunit hcn1 in basket cell terminals of the rat cerebellum. *European Journal of Neuroscience*, 21(8) :2073–2082.
- [Lukatch and MacIver, 1997] Lukatch, H. S. and MacIver, M. B. (1997). Physiology, pharmacology, and topography of cholinergic neocortical oscillations in vitro. *J Neurophysiol*, 77(5) :2427–2445.
- [Lupica et al., 2001] Lupica, C. R., Bell, J. A., Hoffman, A. F., and Watson, P. L. (2001). Contribution of the hyperpolarization-activated current (i_h) to membrane potential and gaba release in hippocampal interneurons. *J Neurophysiol*, 86(1) :261–268.
- [Lüthi et al., 1998] Lüthi, A., Bal, T., and McCormick, D. A. (1998). Periodicity of thalamic spindle waves is abolished by zd7288, a blocker of i_h . *J Neurophysiol*, 79(6) :3284–3289.
- [Lüthi and McCormick, 1998a] Lüthi, A. and McCormick, D. A. (1998a). H-current : properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron*, 21(1) :9–12.

- [Lüthi and McCormick, 1998b] Lüthi, A. and McCormick, D. A. (1998b). Periodicity of thalamic synchronized oscillations : the role of ca^{2+} -mediated upregulation of ih. *Neuron*, 20(3) :553–563.
- [Lüthi and McCormick, 1999] Lüthi, A. and McCormick, D. A. (1999). Modulation of a pacemaker current through ca^{2+} -induced stimulation of camp production. *Nat Neurosci*, 2(7) :634–641.
- [Maccaferri and Dingledine, 2002] Maccaferri, G. and Dingledine, R. (2002). Control of feedforward dendritic inhibition by nmda receptor-dependent spike timing in hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 22(13) :5462–5472.
- [Maccaferri and McBain, 1996] Maccaferri, G. and McBain, C. J. (1996). The hyperpolarization-activated current (ih) and its contribution to pacemaker activity in rat ca1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol*, 497 (Pt 1) :119–130.
- [Magee, 1998] Magee, J. C. (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal ca1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 18(19) :7613–7624.
- [Magee, 1999] Magee, J. C. (1999). Dendritic lh normalizes temporal summation in hippocampal ca1 neurons. *Nat Neurosci*, 2(6) :508–514.
- [Magee, 2001] Magee, J. C. (2001). Dendritic mechanisms of phase precession in hippocampal ca1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 86(1) :528–532.
- [Magee, 2003] Magee, J. C. (2003). A prominent role for intrinsic neuronal properties in temporal coding. *Trends in Neurosciences*, 26(1) :14–16.
- [Magee and Cook, 2000] Magee, J. C. and Cook, E. P. (2000). Somatic epsp amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, 3(9) :895–903.
- [Mainen and Sejnowski, 1995] Mainen, Z. F. and Sejnowski, T. J. (1995). Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science*, 268(5216) :1503–1506.
- [Mayer and Westbrook, 1983] Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. (1983). A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J Physiol*, 340 :19–45.
- [McCormick and Bal, 1997] McCormick, D. A. and Bal, T. (1997). Sleep and arousal : thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci*, 20 :185–215.
- [Migliore and Shepherd, 2002] Migliore, M. and Shepherd, G. M. (2002). Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat Rev Neurosci*, 3(5) :362–370.
- [Mistrík et al., 2005] Mistrík, P., Mader, R., Michalakis, S., Weidinger, M., Pfeifer, A., and Biel, M. (2005). The murine *hcn3* gene encodes a hyperpolarization-activated

- cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 280(29) :27056–27061.
- [Mittmann et al., 2005] Mittmann, W., Koch, U., and Hausser, M. (2005). Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar purkinje cells. *The Journal of Physiology*, 563(2) :369–378.
- [Mongillo et al., 2004] Mongillo, M., McSorley, T., Evellin, S., Sood, A., Lissandron, V., Terrin, A., Huston, E., Hannawacker, A., Lohse, M. J., Pozzan, T., Houslay, M. D., and Zaccolo, M. (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of camp dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res*, 95(1) :67–75.
- [Monteggia et al., 2000] Monteggia, L. M., Eisch, A. J., Tang, M. D., Kaczmarek, L. K., and Nestler, E. J. (2000). Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 81(1-2) :129–139.
- [Morris et al., 2004] Morris, N. P., Fyffe, R. E., and Robertson, B. (2004). Characterisation of hyperpolarization-activated currents (i(h)) in the medial septum/diagonal band complex in the mouse. *Brain Res*, 1006(1) :74–86.
- [Néda et al., 2000] Néda, Z., Ravasz, E., Vicsek, T., Brechet, Y., and Barabási, A. L. (2000). Physics of the rhythmic applause. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 61(6 Pt B) :6987–6992.
- [Nolan et al., 2004] Nolan, M. F., Malleret, G., Dudman, J. T., Buhl, D. L., Santoro, B., Gibbs, E., Vronskaya, S., Buzsáki, G., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R., and Morozov, A. (2004). A behavioral role for dendritic integration : Hcn1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of ca1 pyramidal neurons. *Cell*, 119(5) :719–732.
- [Nolan et al., 2003] Nolan, M. F., Malleret, G., Lee, K. H., Gibbs, E., Dudman, J. T., Santoro, B., Yin, D., Thompson, R. F., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R., and Morozov, A. (2003). The hyperpolarization-activated hcn1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar purkinje cells. *Cell*, 115(5) :551–564.
- [Noma and Irisawa, 1976] Noma, A. and Irisawa, H. (1976). Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Arch*, 364(1) :45–52.
- [Notomi and Shigemoto, 2004] Notomi, T. and Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of ih channel subunits, hcn1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol*, 471(3) :241–276.

- [Nowak et al., 1997] Nowak, L. G., Sanchez-Vives, M. V., and McCormick, D. A. (1997). Influence of low and high frequency inputs on spike timing in visual cortical neurons. *Cereb Cortex*, 7(6) :487–501.
- [Ono et al., 1994] Ono, K., Maruoka, F., and Noma, A. (1994). Voltage- and time-dependent block of $i(f)$ by sr^{2+} in rabbit sino-atrial node cells. *Pflugers Arch*, 427(5-6) :437–443.
- [Orban et al., 2006] Orban, G., Kiss, T., and Erdi, P. (2006). Intrinsic and synaptic mechanisms determining the timing of neuron population activity during hippocampal theta oscillation. *J Neurophysiol*.
- [Oviedo and Reyes, 2002] Oviedo, H. and Reyes, A. D. (2002). Boosting of neuronal firing evoked with asynchronous and synchronous inputs to the dendrite. *Nat Neurosci*, 5(3) :261–266.
- [Oviedo and Reyes, 2005] Oviedo, H. and Reyes, A. D. (2005). Variation of input-output properties along the somatodendritic axis of pyramidal neurons. *J Neurosci*, 25(20) :4985–4995.
- [Pape, 1996] Pape, H. C. (1996). Queer current and pacemaker : the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol*, 58 :299–327.
- [Pape and Mager, 1992] Pape, H. C. and Mager, R. (1992). Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron*, 9(3) :441–448.
- [Pedarzani and Storm, 1995] Pedarzani, P. and Storm, J. F. (1995). Protein kinase a-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic amp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25) :11716–11720.
- [Peters et al., 2004] Peters, C. C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J. F., and Isbrandt, D. (2004). Conditional transgenic suppression of m channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nature Neuroscience*, 8(1) :51+.
- [Pian et al., 2006] Pian, P., Bucci, A., Robinson, R. B., and Siegelbaum, S. A. (2006). Regulation of gating and rundown of hcn hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous pip_2 . *J Gen Physiol*, 128(5) :593–604.
- [Pike et al., 2000] Pike, F. G., Goddard, R. S., Suckling, J. M., Ganter, P., Kasthuri, N., and Paulsen, O. (2000). Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents. *J Physiol*, 529 Pt 1 :205–213.
- [Poirazi et al., 2003] Poirazi, P., Brannon, T., and Mel, B. W. (2003). Arithmetic of subthreshold synaptic summation in a model $ca1$ pyramidal cell. *Neuron*, 37(6) :977–987.

- [Ponimaskin et al., 2007] Ponimaskin, E. G., Heine, M., Zeug, A., Voyno-Yasenetskaya, T., and Salonikidis, P. (2007). *Monitoring receptor-mediated changes of intracellular cAMP level by using ion channels and fluorescent proteins as biosensors.*, volume 35 of *Frontiers in Neuroscience*, pages 224+. Serotonin Receptors in Neurobiology Amitabha Chattopadhyay Center for Cellular & Molecular Biology, Hyderabad, India.
- [Ponsioen et al., 2004] Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G. v. d., Zaccolo, M., Moolenaar, W. H., Bos, J. L., and Jalink, K. (2004). Detecting camp-induced epac activation by fluorescence resonance energy transfer : Epac as a novel camp indicator. *EMBO Reports*, 5(12) :1176–1180.
- [Poolos et al., 2002] Poolos, N. P., Migliore, M., and Johnston, D. (2002). Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci*, 5(8) :767–774.
- [Poolos, 2004] Poolos, N. P. P. (2004). The yin and yang of the h-channel and its role in epilepsy. *Epilepsy Curr*, 4(1) :3–6.
- [Pouille and Scanziani, 2001] Pouille, F. and Scanziani, M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science*, 293(5532) :1159–1163.
- [Proenza et al., 2002] Proenza, C., Angoli, D., Agranovich, E., Macri, V., and Accili, E. A. (2002). Pacemaker channels produce an instantaneous current. *J Biol Chem*, 277(7) :5101–5109.
- [Proenza and Yellen, 2006] Proenza, C. and Yellen, G. (2006). Distinct populations of hcn pacemaker channels produce voltage-dependent and voltage-independent currents. *J. Gen. Physiol.*, 127(2) :183–190.
- [Puil et al., 1986] Puil, E., Gimbarzevsky, B., and Miura, R. M. (1986). Quantification of membrane properties of trigeminal root ganglion neurons in guinea pigs. *J Neurophysiol*, 55(5) :995–1016.
- [Rateau and Ropert, 2006] Rateau, Y. and Ropert, N. (2006). Expression of a functional hyperpolarization-activated current (ih) in the mouse nucleus reticularis thalami. *J Neurophysiol*, 95(5) :3073–3085.
- [Reinker et al., 2004] Reinker, S., Puil, E., and Miura, R. M. (2004). Membrane resonance and stochastic resonance modulate firing patterns of thalamocortical neurons. *J Comput Neurosci*, 16(1) :15–25.
- [Rich et al., 2000] Rich, T. C., Fagan, K. A., Nakata, H., Schaack, J., Cooper, D. M., and Karpen, J. W. (2000). Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted camp diffusion. *J Gen Physiol*, 116(2) :147–161.

- [Richter et al., 1997] Richter, H., Klee, R., Heinemann, U., and Eder, C. (1997). Developmental changes of inward rectifier currents in neurons of the rat entorhinal cortex. *Neurosci Lett*, 228(2) :139–141.
- [Robinson and Siegelbaum, 2003] Robinson, R. B. and Siegelbaum, S. A. (2003). Hyperpolarization-activated cation currents : from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol*, 65 :453–480.
- [Robinson et al., 2006] Robinson, R. B. B., Brink, P. R. R., Cohen, I. S. S., and Rosen, M. R. R. (2006). I(f) and the biological pacemaker. *Pharmacol Res*.
- [Rosenbaum and Gordon, 2004] Rosenbaum, T. and Gordon, S. E. (2004). Quickening the pace : looking into the heart of hcn channels. *Neuron*, 42(2) :193–196.
- [Rotstein et al., 2005] Rotstein, H. G. G., Pervouchine, D. D. D., Acker, C. D. D., Gillies, M. J. J., White, J. A. A., Buhl, E. H. H., Whittington, M. A. A., and Kopell, N. (2005). Slow and fast inhibition and an h-current interact to create a theta rhythm in a model of cal interneuron network. *J Neurophysiol*.
- [Santoro and Baram, 2003] Santoro, B. and Baram, T. Z. (2003). The multiple personalities of h-channels. *Trends Neurosci*, 26(10) :550–554.
- [Santoro et al., 2000] Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R., and Siegelbaum, S. A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse cns. *J Neurosci*, 20(14) :5264–5275.
- [Santoro et al., 1997] Santoro, B., Grant, S. G., Bartsch, D., and Kandel, E. R. (1997). Interactive cloning with the sh3 domain of n-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26) :14815–14820.
- [Santoro et al., 1998] Santoro, B., Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., and Tibbs, G. R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*, 93(5) :717–729.
- [Santoro and Tibbs, 1999] Santoro, B. and Tibbs, G. R. (1999). The hcn gene family : molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868 :741–764.
- [Santoro et al., 2004] Santoro, B., Wainger, B. J., and Siegelbaum, S. A. (2004). Regulation of hcn channel surface expression by a novel c-terminal protein-protein interaction. *J Neurosci*, 24(47) :10750–10762.
- [Savtchenko et al., 2001] Savtchenko, L. P., Gogan, P., and Tyc-Dumont, S. (2001). Dendritic spatial flicker of local membrane potential due to channel noise and probabilistic firing of hippocampal neurons in culture. *Neurosci Res*, 41(2) :161–183.

- [Schoppa and Westbrook, 1999] Schoppa, N. E. and Westbrook, G. L. (1999). Regulation of synaptic timing in the olfactory bulb by an a-type potassium current. *Nat Neurosci*, 2(12) :1106–1113.
- [Schwartz, 2001] Schwartz, J. H. (2001). The many dimensions of camp signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24) :13482–13484.
- [Seeger and Alzheimer, 2001] Seeger, T. and Alzheimer, C. (2001). Muscarinic activation of inwardly rectifying k(+) conductance reduces epsps in rat hippocampal cal pyramidal cells. *J Physiol*, 535(Pt 2) :383–396.
- [Shah et al., 2004] Shah, M. M., Anderson, A. E., Leung, V., Lin, X., and Johnston, D. (2004). Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer iii pyramidal neurons. *Neuron*, 44(3) :495–508.
- [Shin et al., 2004] Shin, K. S., Maertens, C., Proenza, C., Rothberg, B. S., and Yellen, G. (2004). Inactivation in hcn channels results from reclosure of the activation gate : desensitization to voltage. *Neuron*, 41(5) :737–744.
- [Singer and Gray, 1995] Singer, W. and Gray, C. M. (1995). Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, 18 :555–586.
- [Soleng et al., 2003] Soleng, A. F., Chiu, K., and Raastad, M. (2003). Unmyelinated axons in the rat hippocampus hyperpolarize and activate an h current when spike frequency exceeds 1 hz. *J Physiol*, 552(Pt 2) :459–470.
- [Sourdet et al., 2003] Sourdet, V., Russier, M., Daoudal, G., Ankri, N., and Debanne, D. (2003). Long-term enhancement of neuronal excitability and temporal fidelity mediated by metabotropic glutamate receptor subtype 5. *J Neurosci*, 23(32) :10238–10248.
- [Southan et al., 2000] Southan, A. P., Morris, N. P., Stephens, G. J., and Robertson, B. (2000). Hyperpolarization-activated currents in presynaptic terminals of mouse cerebellar basket cells. *J Physiol*, 526 Pt 1 :91–97.
- [Stieber et al., 2005] Stieber, J., Stöckl, G., Herrmann, S., Haßfurth, B., and Hofmann, F. (2005). Functional expression of the human hcn3 channel. *J Biol Chem*.
- [Strata et al., 1997] Strata, F., Atzori, M., Molnar, M., Ugolini, G., Tempia, F., and Cherubini, E. (1997). A pacemaker current in dye-coupled hilar interneurons contributes to the generation of giant gabaergic potentials in developing hippocampus. *J Neurosci*, 17(4) :1435–1446.
- [Surges et al., 2006] Surges, R., Brewster, A. L., Bender, R. A., Beck, H., Feuerstein, T. J., and Baram, T. Z. (2006). Regulated expression of hcn channels and camp levels shape the properties of the h current in developing rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 24(1) :94–104.

- [Svoboda and Lupica, 1998] Svoboda, K. R. and Lupica, C. R. (1998). Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (ih) currents. *J Neurosci*, 18(18) :7084–7098.
- [Takigawa and Alzheimer, 2003] Takigawa, T. and Alzheimer, C. (2003). Interplay between activation of girk current and deactivation of ih modifies temporal integration of excitatory input in ca1 pyramidal cells. *J Neurophysiol*, 89(4) :2238–2244.
- [Ulens and Tytgat, 2001] Ulens, C. and Tytgat, J. (2001). Functional heteromerization of hcn1 and hcn2 pacemaker channels. *J Biol Chem*, 276(9) :6069–6072.
- [Ulrich, 2002] Ulrich, D. (2002). Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol*, 87(6) :2753–2759.
- [Vanhoose et al., 2004] Vanhoose, A. M., Ritchie, M. D., and Winder, D. G. (2004). Regulation of camp levels in area ca1 of hippocampus by gi/o-coupled receptors is stimulus dependent in mice. *Neurosci Lett*, 370(1) :80–83.
- [Vanhoose and Winder, 2003] Vanhoose, A. M. and Winder, D. G. (2003). Nmda and beta1-adrenergic receptors differentially signal phosphorylation of glutamate receptor type 1 in area ca1 of hippocampus. *J Neurosci*, 23(13) :5827–5834.
- [VanRullen et al., 2005] VanRullen, R., Guyonneau, R., and Thorpe, S. J. (2005). Spike times make sense. *Trends Neurosci*, 28(1) :1–4.
- [Vasilyev and Barish, 2002] Vasilyev, D. V. and Barish, M. E. (2002). Postnatal development of the hyperpolarization-activated excitatory current ih in mouse hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 22(20) :8992–9004.
- [Vassalle, 1995] Vassalle, M. (1995). The pacemaker current (i(f)) does not play an important role in regulating sa node pacemaker activity. *Cardiovasc Res*, 30(2) :309–310.
- [Veredas et al., 2005] Veredas, F. J., Vico, F. J., and Alonso, J.-M. (2005). Factors determining the precision of the correlated firing generated by a monosynaptic connection in the cat visual pathway. *The Journal of Physiology*, 567(3) :1057–1078.
- [Wainger et al., 2001] Wainger, B. J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S. A., and Tibbs, G. R. (2001). Molecular mechanism of camp modulation of hcn pacemaker channels. *Nature*, 411(6839) :805–810.
- [Wang et al., 2003] Wang, H., Pineda, V. V., Chan, G. C., Wong, S. T., Muglia, L. J., and Storm, D. R. (2003). Type 8 adenylyl cyclase is targeted to excitatory synapses and required for mossy fiber long-term potentiation. *J Neurosci*, 23(30) :9710–9718.
- [Wang et al., 2001] Wang, J., Chen, S., and Siegelbaum, S. A. (2001). Regulation of hyperpolarization-activated hcn channel gating and camp modulation due to interactions of cooh terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol*, 118(3) :237–250.

- [Wang et al., 2006] Wang, W.-T. T., Wan, Y.-H. H., Zhu, J.-L. L., Lei, G.-S. S., Wang, Y.-Y. Y., Zhang, P., and Hu, S.-J. J. (2006). Theta-frequency membrane resonance and its ionic mechanisms in rat subicular pyramidal neurons. *Neuroscience*.
- [Wehr and Zador, 2003] Wehr, M. and Zador, A. M. (2003). Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*, 426(6965) :442–446.
- [Williams and Stuart, 2000] Williams, S. R. and Stuart, G. J. (2000). Site independence of epsp time course is mediated by dendritic i(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 83(5) :3177–3182.
- [Williams and Stuart, 2003] Williams, S. R. and Stuart, G. J. (2003). Voltage- and site-dependent control of the somatic impact of dendritic ipsp. *J Neurosci*, 23(19) :7358–7367.
- [Wollmuth and Hille, 1992] Wollmuth, L. P. and Hille, B. (1992). Ionic selectivity of ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J Gen Physiol*, 100(5) :749–765.
- [Wong et al., 1999] Wong, S. T., Athos, J., Figueroa, X. A., Pineda, V. V., Schaefer, M. L., Chavkin, C. C., Muglia, L. J., and Storm, D. R. (1999). Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase ltp. *Neuron*, 23(4) :787–798.
- [Xu et al., 2004] Xu, C., Datta, S., Wu, M., and Alreja, M. (2004). Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the h-current in septohippocampal gabaergic neurons. *Eur J Neurosci*, 19(8) :2299–2309.
- [Yamada et al., 2005] Yamada, R., Kuba, H., Ishii, T. M., and Ohmori, H. (2005). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels regulate auditory coincidence detection in nucleus laminaris of the chick. *J Neurosci*, 25(39) :8867–8877.
- [Yasui et al., 2005] Yasui, T., Fujisawa, S., Tsukamoto, M., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2005). Dynamic synapses as archives of synaptic history : state-dependent redistribution of synaptic efficacy in the rat hippocampal ca1. *The Journal of Physiology*, 566(1) :143–160.
- [Ying et al., 2006] Ying, S.-W., Abbas, S. Y., Harrison, N. L., and Goldstein, P. A. (2006). Propofol block of ih contributes to the suppression of neuronal excitability and rhythmic burst firing in thalamocortical neurons. *European Journal of Neuroscience*, 23(2) :465–480.
- [Yu et al., 1993] Yu, H., Chang, F., and Cohen, I. S. (1993). Pacemaker current exists in ventricular myocytes. *Circ Res*, 72(1) :232–236.
- [Zaccolo et al., 2005] Zaccolo, M., Cesetti, T., Di Benedetto, G., Mongillo, M., Lissandron, V., Terrin, A., and Zamparo, I. (2005). Imaging the camp-dependent signal transduction pathway. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6) :1323–1326.

- [Zaccolo et al., 2000] Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C. Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P. A., Taylor, S. S., Tsien, R. Y., and Pozzan, T. (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic amp in living cells. *Nat Cell Biol*, 2(1) :25–29.
- [Zaccolo et al., 2006] Zaccolo, M., Di Benedetto, G., Lissandron, V., Mancuso, L., Terrin, A., and Zamparo, I. (2006). Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger : mechanisms underlying compartmentalized camp signalling. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 4) :495–497.
- [Zaccolo and Pozzan, 2002] Zaccolo, M. and Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of camp in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*, 295(5560) :1711–1715.
- [Zolles et al., 2006] Zolles, G., Klöcker, N., Wenzel, D., Weisser-Thomas, J., Fleischmann, B. K., Roeper, J., and Fakler, B. (2006). Pacemaking by hcn channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron*, 52(6) :1027–1036.
- [Zong et al., 2005] Zong, X., Eckert, C., Yuan, H., Wahl-Schott, C., Abicht, H., Fang, L., Li, R., Mistrik, P., Gerstner, A., Much, B., Baumann, L., Michalakis, S., Zeng, R., Chen, Z., and Biel, M. (2005). A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by src kinase. *J Biol Chem*.

Curriculum Vitae

- Born in 19/08/1979 at Lyon (France)
- citizenship : French
- residence : Le Vignal 12850 Sainte Radegonde (France)
- Contact address : p_gastrein@yahoo.fr

Education :

- **2003/2007 - PhD studies** (defense : 2. May 2007)
cotutorial thesis in Neuroscience
between the Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II (dir. Dominique Debanne)
and the Georg-August Universität, Göttingen (dir. Rainer Kree)
- **2002/2003 - Diplom in Biology**
Georg-August Universität Göttingen
Gut
- **2001/2002 - Licence : Physique**
Université Claude Bernard Lyon I/Ecole Normale Supérieure de Lyon
failed
- **2000/20001 -Maîtrise : Biologie Cellulaire et Physiologie mention génétique moléculaire et cellulaire**
UCBL1/ENSL
Assez Bien
- **1999/2000 - Licence : Biologie Moléculaire et Cellulaire**
UCBL1/ENSL
Assez Bien
- **1999 - Admission in Ecole Normale Supérieure de Lyon**
- **1997/1999 - Classes préparatoires aux grandes Ecoles - BCPST**
- **1997 - Baccalauréat, série S option physique (*Bien*)**

Publication and communications

- GASTREIN P, CZRAN D, RICHTER D, SALONIKIDIS P **Theta oscillations, cAMP und I_H is a feedback control regulatory system in the hippocampus** in preparation.
- GASTREIN P, CAMPANAC E, ANKRI N, DEBANNE D **Hyperpolarization-activated cationic current (I_h) locks cortical oscillations via intrinsic resonance, spiking fidelity and synaptic potential-spike coupling.** almost submitted.
- DEBANNE D, GASTREIN P, CAMPANAC E **Queer channels in hippocampal basket cells : h-current without sag** ; J Physiol, 574(1) :2 ; 2006.
- GASTREIN P, ANKRI N, DEBANNE D **H-current determines integration of EPSP-IPSP/IPSP-EPSP sequences and sets resonance frequency in layer-5 pyramidal neurons** Poster in Conference Jacques Monod July 2005 “Synaptic communication in neuronal networks - from molecules to code”
- GASTREIN P, ANKRI N, DEBANNE D **Integration of EPSP-IPSP sequence in layer-5 pyramidal neurons is determined by I_h -current** Poster in Colloque de la société des Neurosciences Française, Lille, May 2006

Practical Periods

- 2002/2003 - European Neuroscience Institute Göttingen
with Fred Wouters
“Conformations of Tau protein in interaction with Microtubules, a study using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) measuring with donor’s bleaching”
biophysics in a neuroscience thematic
- Summer 2002 - Pattern and Chaos, Physics Department ; Simon Fraser University (Burnaby, British Columbia, Canada)
with John Bechhoeffer
“Influence of sample thickness on the solidification of a liquid crystal”
experimental physics, soft matter physics
- Summer 2001 - Neurobiology and Biophysics - Institut für Biologie III - Albert Ludwigs Universität Freiburg im Breisgau
with Jean-François Léger, Martin Nawrot et Detlef Heck
”Simulation of the dendritic integration with the program NEURON”
programming with the program NEURON
- Winter 2001 - A.G. Neurochimie - Institut für Chemie/Biochemie - Freie Universität

Berlin

with Chris Weise
"Isolation and characterisation of a peripheral membrane protein of the motorplate of the electrical organe of *Torpedo Californica*"

mass spectrophotometry, HPLC, method of Edmann

- Summer 2000 - Laboratoire INSERM U464 "Neurobiologie des canaux ioniques"

with Béatrice Marquèze
"Research of interactions of a new isoform of the rate α -1 sub-unit of the neuronal calcium channel type P/Q "

methods of biochemistry and molecular biology

Languages

- French (mother language)
- German (fluent writing and speaking)
- English
- Spanish (beginner)